

明 細 書

発明の名称：新規エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼ

技術分野

[0001] 本発明は、エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼ（E n d o - S i）、当該酵素をコードする遺伝子、組み換えプラスミド、当該プラスミドにより形質転換された形質転換体及びその使用、ならびに当該酵素を用いた糖鎖リモデリング抗体等の製造方法等に関する。

背景技術

[0002] 抗体は、重鎖分子中のF c領域に位置する297番目のA s n側鎖に結合したN結合型糖鎖（N297結合糖鎖）を有する糖タンパク質分子である。抗体は、基礎研究や医療分野において重要な分子であり、特に抗体医薬としての研究開発が盛んに進められており、糖鎖の様々な影響が明らかにされつつある（非特許文献1）。現在、主に使われている医療用抗体は、I g Gクラスの分子であり、このような抗体は、一般的にC H O細胞やN S O細胞に代表される培養動物細胞を用いて産生され、これら動物細胞で産生される抗体のN297結合糖鎖はb i a n t e n n a r y複合型糖鎖であるが、コアフコースや末端のシアル基やガラクトシル基そしてb i s e c t i n g G l c N A cにおいて不均一なものが取得される（非特許文献2）。抗体のN297結合糖鎖が、抗体のA D C C活性（A n t i b o d y - D e p e n d e n t C e l l - M e d i a t e d C y t o t o x i c i t y）やC D C活性（C o m p l e m e n t - D e p e n d e n t C y t o t o x i c i t y）を含むエフェクター活性に大きく影響することが明らかになっており（非特許文献3、非特許文献4）、抗体の血中半減期にも影響を及ぼす可能性が指摘されている（非特許文献5）。また、N297結合糖鎖の非還元末端が2, 6 - s i a l y l化された抗体がI V I G（i n t r a v e n o u s i m m u n o g l o b u l i n）における主要薬効成分であることが明らかになっている（非特許文献6）。また、I g GやF c断片を含む医療

用分子において、N297結合糖鎖の不均一性が有効成分としての性質や品質に大きな影響を与えると考えられており、不均一な糖鎖修飾分子の微量の混入が最終生産物の特性を大きく変えてしまう可能性を否定できない。

[0003] この様な現状から、医療用の抗体や抗体Fc領域を含む糖タンパク質分子の製造において、糖鎖を均一化させる技術が開発されつつある。糖タンパク質に付加する糖鎖を均一にする方法としては、酵素を使った糖鎖転移反応が知られている（非特許文献7～9）。これは、*in vitro*環境での糖鎖の切断（加水分解反応）と別の糖鎖の縮合（糖鎖転移反応）からなる、多段階プロセスである。特にN型糖鎖の変換を目的とする場合、エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）と呼ばれる一群の酵素ファミリーが用いられる。この酵素の特性として、1）基質特異性として複合型糖鎖に対する加水分解反応を行う能力を持つこと、及び、2）特定の構造に対する糖鎖転移反応を行う能力を持つことが要求される。糖鎖転移反応では、単独のENGaseを用いて還元末端をオキサゾリン化した糖鎖をGlcNAc（N-アセチルグルコサミン）アクセプターに転移する方法（非特許文献7～8）と2種類のENGaseを使用して糖鎖をGlcNAcアクセプターに直接転移するワンポット法が知られている（非特許文献9、特許文献1）。ENGaseは様々な生物種から分離されており、基質とする糖鎖の種類に応じて野生型やその変異酵素が使い分けられる。

[0004] ENGaseとして、Endo-A (*Arthrobacter protophormiae*由来酵素)（非特許文献10）、Endo-D (*Streptococcus pneumoniae*由来酵素)（非特許文献11）、Endo-M (*Mucor hiemalis*由来酵素)（非特許文献12）、Endo-H（非特許文献13）、Endo-F2 (*Flavobacterium meningosepticum*由来酵素)、Endo-F3 (*Flavobacterium meningosepticum*由来酵素)（非特許文献14）、Endo-E (*Enterococcus faecalis*由来酵素)（非特許文献15）、Endo-S (*St*

reptococcus pygenes 由来酵素) (非特許文献16)、
Endo-Tsp1006 (*Tannerella* 属細菌由来)、Endo-
Tsp1263 (*Tannerella* 属細菌由来)、Endo-Bno
1263 (*Bacteroides* 属細菌由来)、Endo-Tsp145
7 (*Tannerella* 属細菌由来)、Endo-Bac1008 (*Mu
ribaculum* 属細菌由来)、Endo-Tsp1603 (*Tanne
rella* 属細菌由来)、Endo-Tsp1263 (*Tannerella*
a 属細菌由来) (特許文献2)、スフィンゴバクテリウム属細菌由来のエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ (ORF1152)、スフィンゴ
バクテリウム属細菌由来のエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ (ORF1188)、スフィンゴバクテリウム属細菌由来のエンドーβ-N-
アセチルグルコサミニダーゼ (ORF3046)、スフィンゴバクテリウ
ム属細菌由来のエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ (ORF37
50)、*Cordyceps* 属糸状菌由来のエンドーβ-N-アセチルグル
コサミニダーゼ、*Beauveria* 属糸状菌由来のエンドーβ-N-アセ
チルグルコサミニダーゼ (非特許文献17)、Endo-CC1 (*Copr
inopsis cinerea* 由来酵素)、Endo-CC2 (*Copr
inopsis cinerea* 由来酵素) (非特許文献18)、Endo-
Om (*Ogataea minuta* 由来酵素) (非特許文献19)、E
ndo-CE (*Caenorhabditis elegans* 由来酵素)
(非特許文献20)、Endo-BH (*Bacillus halodu
rans C-125* 由来酵素) (非特許文献21)、EndoSd (*St
reptococcus dysgalactiae* 由来酵素)、Endo
S2d (*Streptococcus dysgalactiae* 由来酵素
) (非特許文献22)、EndoSe (*Streptococcus eq
ui subsp. equi* 由来酵素) (非特許文献23)、Endo-
Rp (*Rhizomucor pusillus* 由来酵素) (特許文献3)
、EndoS2もしくはEndoS49 (非特許文献24) などが知られて

いる。

- [0005] これらの中で、抗体のコアフコースを有する複合型のN297結合糖鎖を基質とし、加水分解活性と糖鎖転移活性を併せ持つことが確認できている酵素として、EndoS（非特許文献25）、EndoS2（非特許文献26）、Endo-F3（非特許文献27）が知られている。
- [0006] EndoSにおいては、その変異酵素であるEndoS D233Qは、加水分解活性がある程度抑制されることが知られている。この変異酵素は反応系中に糖鎖の還元末端をオキサゾリン化した中間体が大量に存在する条件下で、糖鎖転移反応が選択的に進行することが知られている（特許文献4、非特許文献8）。
- [0007] また、EndoS D233Qに、更なる変異を追加して導入することでEndoS D233Q酵素と比較して糖鎖転移活性が高くなるか、あるいは、加水分解活性が低くなることが知られている（特許文献5）。
- [0008] EndoS2変異酵素（D184Q）は野生型EndoS2酵素と比較して増加した糖鎖転移活性および減少した加水分解活性を示すことが知られている（特許文献6～8、非特許文献28）。
- [0009] Endo-F3変異酵素（D165A、またはD165Q）は野生型Endo-F3酵素と比較して生成物に対する加水分解活性が減少し、糖オキサゾリンの糖鎖転移活性が高くなることが知られている。また、Endo-F3変異酵素は、糖鎖転移反応の基質として二分岐および三分岐糖鎖オキサゾリンの使用が可能である（非特許文献27）。
- [0010] 糖鎖を直接GlcNAcアクセプターに転移するワンポット法で使用されるENGaseとしては、EndoS/EndoS変異酵素とEndo-M/Endo-M変異酵素もしくはEndo-CC/Endo-CC変異酵素の2種類の酵素の組合せが知られている（特許文献1、非特許文献9）。
- [0011] Streptococcus iniae（非特許文献29）は魚の病原菌として知られており、日本ではヒラメやマダイの養殖で被害が大きい（非特許文献30）。そのためヒラメβ溶血性レンサ球菌症不活化ワクチンとし

てMバックイニエ（松研薬品工業株式会社）が販売されている。ヒトや農林水産業に深刻な影響を与える病原菌である *Streptococcus* 属の菌株はゲノム解析による分類が盛んに行われており（非特許文献31）、*S. i n i a e* についても *ENGase* 配列の存在は知られていたが、酵素活性が調べられたことはなかった（非特許文献24）。

先行技術文献

特許文献

- [0012] 特許文献1：WO2018/003983
特許文献2：JP2020-022440
特許文献3：WO2018/101451
特許文献4：WO2013/120066
特許文献5：WO2017/010559
特許文献6：WO2017/124084
特許文献7：WO2018/039373
特許文献8：JP2020-500549

非特許文献

- [0013] 非特許文献1：Arnold JN, et al., Annu Rev Immunol. 2007, 25, 21-50
非特許文献2：Jefferis R, Biotechnol Prog. 2005, 21, 11-16
非特許文献3：Nimmerjahn F, et al., Nat Rev Immunol. 2008, 8, 34-47
非特許文献4：Jefferis R, Nat Rev Drug Discov. 2009, 8, 226-234
非特許文献5：Bumbaca D, et al., AAPS J. 2012, 14, 554-558
非特許文献6：Anthony RM, et al., Science. 2008, 320, 373-376

- 非特許文献7: Wang LX, Trends Glycosci Glycotechnol. 2011, 23, 33-52
- 非特許文献8: Huang W, et al., J Am Chem Soc. 2012, 134, 12308-12318
- 非特許文献9: Iwamoto M, et al., PLoS ONE 2018, 13, e0193534
- 非特許文献10: Takegawa K, et al., Biochem Int. 1991, 24, 849-855
- 非特許文献11: Fan SQ, et al., J Biol Chem. 2012, 287, 11272-11281
- 非特許文献12: Yamamoto K, et al., Biochem Biophys Res Commun. 1994, 203, 244-252
- 非特許文献13: Robbins PW, et al., J Biol Chem. 1984, 259, 7577-7583
- 非特許文献14: Huang W, et al., Chembiochem. 2011, 12, 932-941
- 非特許文献15: Collin M and Fischetti VA. J Biol Chem. 2004, 279, 22558-22570
- 非特許文献16: Collin M and Olsen A., EMBO J. 2001, 20, 3046-3055
- 非特許文献17: Huang Y, et al., Sci Rep. 2018, 8, 246
- 非特許文献18: Eshima Y, et al., PLoS One. 2015, 10, e0132859
- 非特許文献19: Murakami S, et al., Glycobiology. 2013, 23, 736-744

非特許文献20: Kato T, et al., Glycobiology. 2002, 12, 581-587

非特許文献21: Fujita K, et al., Biosci Biotechnol Biochem. 2004, 68, 1059-1066

非特許文献22: Shadnezhad A, et al., Future Microbiol. 2016, 11, 721-736

非特許文献23: Flock M, et al., Infect Immun. 2012, 80, 2914-2919

非特許文献24: Sjogren J, et al., Biochem J. 2013, 455, 107-118

非特許文献25: Goodfellow JJ, et al., J Am Chem Soc. 2012, 134, 8030-8033

非特許文献26: Shivatare SS, et al., Chem Commun (Camb). 2018, 54, 6161-6164

非特許文献27: Giddens JP, et al., J Biol Chem. 2016, 291, 9356-9370

非特許文献28: Li T, et al., J Biol Chem. 2016, 291, 16508-16518

非特許文献29: Pier GB and Madin SH., Int J Syst Bacteriol. 1976 26, 545-553

非特許文献30: Yoshida T., Fish Pathology. 2016, 51, 44-48

非特許文献31: Vincent P, et al., Genome Biology and Evolution, 2014, 6, 741-753

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は、糖タンパク質のN297結合糖鎖に対する加水分解活性及び／又は糖鎖転移活性を有する新規エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、*Streptococcus iniae*に属する菌株からクローニングされたエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ（Endo-Si）がN297結合糖鎖に対する加水分解活性を有すること、またEndo-Siに変異を導入することにより、加水分解活性がより抑えられ、かつ、一定以上の糖鎖転移活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0016] 本発明は、以下の発明を提供する。

[1] 配列番号2のアミノ酸番号34乃至928に記載のアミノ酸配列、又は、前記アミノ酸配列において、241番目（D241）、190番目（T190）、311番目（Q311）及び360番目（E360）のアミノ酸からなる群より選択される1又は2以上のアミノ酸部位への変異を含むアミノ酸配列を有し、かつ、糖鎖加水分解活性及び／又は糖鎖転移活性を示すポリペプチド。

[2] 変異が、D241、T190、Q311及びE360のアミノ酸からなる群より選択される1～3個のアミノ酸部位に変異を有することを特徴とする、[1]のポリペプチド。

[3] 以下の（A）～（D）からなる群から選択される1又は2以上の変異を有する、[1]又は[2]のポリペプチド；

（A）配列番号2のアミノ酸配列において、241番目のアミノ酸（D241）が、グルタミン（D241Q）、メチオニン（D241M）、若しくはアラニン（D241A）へ変異、

（B）配列番号2のアミノ酸配列において、190番目のアミノ酸（T190）が、グルタミン（T190Q）へ変異、

（C）配列番号2のアミノ酸配列において、311番目のアミノ酸（Q311）が、グルタミン（Q311Q）へ変異、

1) が、ロイシン (Q 3 1 1 L) へ変異、並びに、

(D) 配列番号 2 のアミノ酸配列において、3 6 0 番目のアミノ酸 (E 3 6 0) が、グルタミン (E 3 6 0 Q)、アラニン (E 3 6 0 A)、アスパラギン (E 3 6 0 N)、若しくはアスパラギン酸 (E 3 6 0 D) へ変異。

[4] 以下の (A) ~ (D) からなる群から選択される 1 又は 2 以上の変異を有する、[1]~[3]のいずれかのポリペプチド；

(A) D 2 4 1 Q 又は D 2 4 1 M、

(B) T 1 9 0 Q、

(C) Q 3 1 1 L、及び、

(D) E 3 6 0 Q。

[5] 以下の (A) ~ (C) に記載のアミノ酸配列を含む、[1]~[4]のいずれかのポリペプチド；

(A) 配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0 及び配列番号 1 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列、

(B) (A) の各配列における 2 4 1 番目、1 9 0 番目、3 1 1 番目、又は、3 6 0 番目のアミノ酸以外のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % 以上の相同性もしくは同一性を有するアミノ酸配列、又は、

(C) (A) の配列において 2 4 1 番目、1 9 0 番目、3 1 1 番目、又は、3 6 0 番目のアミノ酸以外のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列。

[6] N 結合型糖鎖に対して、加水分解活性及び／糖鎖転移活性を示す、[1]~[5]のいずれかのポリペプチド。

[7] N 結合型糖鎖が、糖タンパク質における N 結合型糖鎖である、[6]のポリペプチド。

[8] 糖タンパク質が、抗体又は抗体の F c 領域を含む分子 (F c 領域含有分子) である、[6]又は[7]のポリペプチド。

[9] N 結合型糖鎖が、抗体の 2 9 7 番目の A s n に結合する N 結合型糖鎖

(N297結合糖鎖)である、[6]~[8]のいずれかのポリペプチド。

[10] N297結合糖鎖の非還元末端が化学修飾されていてもよい複合型糖鎖である、[9]のポリペプチド。

[11] N297結合糖鎖が、コアGlcNAcにフコースが付加していてもよいN297結合糖鎖である、[9]又は[10]のポリペプチド。

[12] [1]~[11]のいずれかのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[13] [12]のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[14] [13]の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

[15] [14]の宿主細胞を培養する工程、および当該工程で得られた培養物から目的のポリペプチドを採取する工程を含むことを特徴とする、[1]~[11]のいずれかのポリペプチドの製造方法。

[16][15]の製造方法によって得られた、ポリペプチド。

[17] [1]~[11]のいずれかのポリペプチドの存在下で、N297結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコアGlcNAcを有する抗体又はそのFc領域含有分子であるアクセプター分子を、還元末端が活性化されたGlcNAcを含む糖鎖ドナー分子と反応させることを特徴とする、抗体又はそのFc領域含有分子の製造方法。

[18] 還元末端が活性化されたGlcNAcがオキサゾリン化されたGlcNAcである、[17]の製造方法。

[19] 糖鎖ドナー分子が、非還元末端が化学修飾されていてもよい複合型糖鎖である、[17]又は[18]の製造方法。

[20] 糖鎖ドナー分子が、非還元末端が化学修飾されていてもよいSG(10)-Ox、MSG1(9)-Ox、MSG2(9)-Ox又はMSG1(9)-OxとMSG2(9)-Oxの混合物である、[17]~[19]のいずれかの製造方法。

[21] 糖鎖ドナー分子が、 $[N_3-PEG(3)]_2-SG(10)-Ox$ 、 $[N_3-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox$ 、 $[N_3-PEG(3)]$

—MSG2 (9) —Ox、又は $[N_3-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox$ と $[N_3-PEG(3)]-MSG2(9)-Ox$ の混合物である、[17]～[20]のいずれかの製造方法。

[22] 更に、アジド基 (N_3-) にアルキン構造を有する分子と反応させる工程を含む、[21]の製造方法。

[23] アルキン構造を有する分子が、化学療法剤、分子標的薬、免疫活性化剤、毒素、抗菌剤、抗ウイルス剤、診断用薬剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、抗原、脂質、リポソーム、ビタミン、ホルモンから選択される、[22]の製造方法。

[24] 化学療法剤が、カンプトテシン、ピロロベンゾジアゼピン、ドキソルビシン、オーリスタチン、タキサンもしくはその誘導体から選択される、[23]の製造方法。

[25] 免疫活性化剤が、STINGアゴニスト、TLRアゴニスト、A2ARアンタゴニスト、IDO阻害剤、CTLA-4、LAG-3及びPD-1経路のアンタゴニスト、チェックポイント阻害剤、血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体阻害剤、スムーズン (smoothen) 阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、レチノイド、抗がんワクチン、アジュバントから選択される、[23]の製造方法。

[26] アルキン構造を有する分子が、(A)～(E)からなる群から選択される、[23]～[25]のいずれかの製造方法。

(A) $N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] \text{アゾシン}-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル] \text{グリシルグリシル-L-バリル-N}-\{4-[(\{[(11'S, 11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-\{[(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] \text{ベンゾジアゼピン}-8-イル] オキシ\} \text{ペンチル}) オキシ\}-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ [シクロプロパン-1, 2'-ピロロ [2, 1-c] [$

1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) - イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} - L - アラニンアミド、

(B) N - [4 - (11, 12 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - バリル - N - [4 - ({ [(11' S, 11' a S) - 11' - ヒドロキシ - 7' - メトキシ - 8' - (3 - { [(11 a S) - 7 - メトキシ - 2 - (4 - メトキシフェニル) - 5 - オキソ - 5, 10, 11, 11 a - テトラヒドロ - 1 H - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 8 - イル] オキシ} プロポキシ) - 5' - オキソ - 11', 11' a - ジヒドロ - 1' H, 3' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) - カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] - L - アラニンアミド、

(C) N - [4 - (11, 12 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - バリル - N - {4 - [({ [(11' S, 11 a' S) - 11' - ヒドロキシ - 7' - メトキシ - 8' - [(5 - { [(11 a' S) - 7' - メトキシ - 5' - オキソ - 5', 11 a' - ジヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 8' - イル] オキシ} ペンチル) オキシ] - 5' - オキソ - 11', 11 a' - ジヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) - イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} - L - アラニンアミド、

(D) N - [4 - (11, 12 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - バリル - N - {4 - [({ [(11' S, 11 a' S) - 11' - ヒドロキシ - 7' - メトキシ - 8' - [(5 - { [(11 a' S) - 7' - メトキシ - 5' - オキソ - 5', 10', 11', 11 a' - テトラヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾ

ジアゼピン] - 8' - イル] オキシ} ペンチル) オキシ] - 5' - オキソ - 1 1' , 1 1 a' - ジヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 1 0' (5' H) - イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} - L - アラニンアミド、並びに、

(E) (ビス (N, N - ジエチルエタンアミニウム) N - [4 - (1 1, 1 2 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - フェニルアラニル - N - [(2 - {9 - [(5 R, 7 R, 8 R, 1 2 a R, 1 4 R, 1 5 R, 1 5 a R, 1 6 R) - 1 5 - フルオロ - 1 6 - ヒドロキシ - 2, 1 0 - ジオキソ - 2, 1 0 - ジスルフィド - 1 4 - (6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 2 H - 2, 3, 5, 6 - テトラアザベンゾ [c d] アズレン - 2 - イル) オクタヒドロ - 2 H, 1 0 H, 1 2 H - 5, 8 - メタノ - 2 λ^5 , 1 0 λ^5 - フロ [3, 2 - 1] [1, 3, 6, 9, 1 1, 2, 1 0] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン - 7 - イル] - 6 - オキソ - 6, 9 - ジヒドロ - 1 H - プリン - 1 - イル} エトキシ) メチル] グリシンアミド。

[2 7] アクセプター分子が、フコースが付加していてもよいコア G I c N A c からなる N 2 9 7 結合糖鎖を有する抗体又は F c 領域含有分子である [1 7] ~ [2 6] のいずれかの製造方法。

[2 8] [1] ~ [1 1] のいずれかのポリペプチド及び還元末端が活性化されていない糖鎖ドナー分子の複合型糖鎖を基質とするが N 2 9 7 結合糖鎖を基質としないエンド - β - N - アセチルグルコサミニダーゼ (酵素 A (E n z y m e A と記載する)) の存在下で、

N 2 9 7 結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコア G I c N A c を有する抗体若しくはその F c 領域含有分子であるアクセプター分子を、還元末端が活性化されていない G I c N A c を含む糖鎖ドナー分子と反応させることを特徴とする、抗体又は F c 領域含有分子の製造方法。

[2 9] [1] ~ [1 1] のいずれかのポリペプチド、酵素 A、アクセプター分

子及び糖鎖ドナー分子を同一の反応液中で反応させることを特徴とする、[27]の製造方法。

[30] 糖鎖ドナー分子が、非還元末端が化学修飾されていてもよい複合型糖鎖である、[28]又は[29]の製造方法。

[31] 糖鎖ドナー分子が、非還元末端が化学修飾されていても良いSGP、(SG-)Asn、(MSG1-)Asn、(MSG2-)Asn、(MSG1-)Asnと(MSG2-)Asnの混合物である、[28]～[30]のいずれかの製造方法。

[32] 糖鎖ドナー分子が、([N₃-PEG(3)]₂-SG-)Asn-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG1-)Asn-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG2-)Asn-PEG(3)-N₃、又は([N₃-PEG(3)]-MSG1-)Asn-PEG(3)-N₃と([N₃-PEG(3)]-MSG2-)Asn-PEG(3)-N₃の混合物である、[28]～[31]のいずれかの製造方法。

[33] 更に、アジド基(N₃-)にアルキン構造を有する分子と反応させる工程を含む、[32]の製造方法。

[34] アルキン構造を有する分子が、化学療法剤、分子標的薬、免疫活性化剤、毒素、抗菌剤、抗ウイルス剤、診断用薬剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、抗原、脂質、リポソーム、ビタミン、ホルモンから選択される、[33]の製造方法。

[35] 化学療法剤が、カンプトテシン、ピロロベンゾジアゼピン、ドキソルビシン、オーリスタチン、タキサンもしくはその誘導体から選択される、[34]の製造方法。

[36] 免疫活性化剤が、STINGアゴニスト、TLRアゴニスト、A2ARアンタゴニスト、IDO阻害剤、CTLA-4、LAG-3及びPD-1経路のアンタゴニスト、チェックポイント阻害剤、血管内皮増殖因子(VEGF)受容体阻害剤、スムーズン(smoothen)阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、レチノイド、抗がんワクチン、アジュバントから選択さ

れる、[34]の製造方法。

[37] アルキン構造を有する分子が、(A)～(E)からなる群から選択される、[34]～[36]のいずれかの製造方法；

(A) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[(11'S, 11'a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{[(11'aS)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11'a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-5'-オキソ-11', 11'a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル]カルボニル}オキシ}メチル]フェニル]-L-アラニンアミド、

(B) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-[(11'S, 11'aS)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-(3-{[(11'aS)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11'a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}プロボキシ)-5'-オキソ-11', 11'a'-ジヒドロ-1'H, 3'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-カルボニル]オキシ}メチル]フェニル]-L-アラニンアミド、

(C) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[(11'S, 11'a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{[(11'a'S)-7'-メトキシ-5'-オキソ-5', 11'a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン

−1, 2′−ピロロ [2, 1−c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] −8′ −
 イル] オキシ} ペンチル) オキシ] −5′ −オキソ−1 1′, 1 1 a′ −ジ
 ヒドロ−1′ H−スピロ [シクロプロパン−1, 2′ −ピロロ [2, 1−c
] [1, 4] ベンゾジアゼピン] −1 0′ (5′ H) −イル] カルボニル}
 オキシ) メチル] フェニル} −L−アラニンアミド、

(D) N− [4− (1 1, 1 2−ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン−
 5 (6 H) −イル) −4−オキソブタノイル] グリシルグリシル−L−バリ
 ル−N− {4− [({ [(1 1′ S, 1 1 a′ S) −1 1′ −ヒドロキシ−
 7′ −メトキシ−8′ − [(5− { [(1 1 a′ S) −7′ −メトキシ−5
 ′ −オキソ−5′, 1 0′, 1 1′, 1 1 a′ −テトラヒドロ−1′ H−ス
 ピロ [シクロプロパン−1, 2′ −ピロロ [2, 1−c] [1, 4] ベンゾ
 ジアゼピン] −8′ −イル] オキシ} ペンチル) オキシ] −5′ −オキソ−
 1 1′, 1 1 a′ −ジヒドロ−1′ H−スピロ [シクロプロパン−1, 2′
 −ピロロ [2, 1−c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] −1 0′ (5′ H)
 −イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} −L−アラニンアミド、
 並びに、

(E) (ビス (N, N−ジエチルエタンアミニウム) N− [4− (1 1,
 1 2−ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン−5 (6 H) −イル) −4−
 オキソブタノイル] グリシルグリシル−L−フェニルアラニル−N− [(2
 − {9− [(5 R, 7 R, 8 R, 1 2 a R, 1 4 R, 1 5 R, 1 5 a R, 1
 6 R) −1 5−フルオロ−1 6−ヒドロキシ−2, 1 0−ジオキソ−2, 1
 0−ジスルフィド−1 4− (6, 7, 8, 9−テトラヒドロ−2 H−2, 3
 , 5, 6−テトラアザベンゾ [c d] アズレン−2 −イル) オクタヒドロ−
 2 H, 1 0 H, 1 2 H−5, 8−メタノ−2 λ⁵, 1 0 λ⁵−フロ [3, 2−
 I] [1, 3, 6, 9, 1 1, 2, 1 0] ペンタオキサジホスファシクロテ
 トラデシン−7 −イル] −6−オキソ−6, 9−ジヒドロ−1 H−プリン−
 1 −イル} エトキシ) メチル] グリシンアミド。

[38] アクセプター分子が、フコースが付加していてもよいコアG I c N

A c からなる N 2 9 7 結合糖鎖を有する抗体又はもしくは F c 領域含有分子である[28]～[37]のいずれかの製造方法。

[39] 酵素 A が、SGP から G l c N A c を有するアクセプターへの糖鎖転移活性を有する酵素である、[28]～[38]のいずれかの製造方法。

[40] 酵素 A が、Endo-M、Endo-Rp、Endo-Om、Endo-CC、又はそれらの加水分解活性を低下させた変異酵素である、[28]～[39]のいずれかの製造方法。

[41] 加水分解活性を低下させた変異酵素が、Endo-Rp N172Q、Endo-Rp N172H、Endo-Rp N172A、Endo-Rp N172C、Endo-Rp N172D、Endo-Rp N172E、Endo-Rp N172G、Endo-Rp N172I、Endo-Rp N172L、Endo-Rp N172M、Endo-Rp N172P、Endo-Rp N172S、Endo-Rp N172T、Endo-Rp N172V、Endo-Rp W278F/S216V、Endo-Rp W278F/N246D、Endo-Rp W278F/D276N、Endo-Rp W278F/A310D、Endo-Rp W278F/N172D/F307Y、Endo-Rp W278F/N172D/F307H、Endo-Rp W278F/N172D/A310D、Endo-Rp W214F/F307Y/L306I、Endo-M N175Q、Endo-CC N180H及びEndo-Om N194Q からなる群から選択される、[40]の製造方法。

[42] [17]～[41]のいずれかの製造方法で得られた抗体又は F c 領域含有分子。

[43] 抗体又は F c 領域含有分子に、配列番号 2 のアミノ酸番号 34 乃至 928 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを作用させることを特徴とする、フコースが付加していてもよいコア G l c N A c のみを有する抗体又は F c 領域含有分子の製造方法。

[44] [43]の製造方法で得られたコア G l c N A c のみを有する抗体又

はもしくはFc領域含有分子。

- [0017] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2020-147745号の開示内容を包含する。

発明の効果

- [0018] 本発明のEndo-Si酵素は、良好な加水分解活性を有し、糖タンパク質のN297結合を含むN結合型糖鎖に作用して、糖鎖中に存在するコアキトピオース構造のGlcNAc間の $\beta 1, 4$ -グリコシド結合を効率よく切断することができる。遊離された糖鎖は、糖タンパク質の糖鎖構造解析のための試料、及び糖鎖誘導体の原料として利用することができる。糖タンパク質を基質に用いた場合、糖鎖が加水分解された糖タンパク質は、糖鎖リモデリングのアクセプター分子として利用することが可能である。
- [0019] また、Endo-Siに変異を導入したEndo-Si変異酵素は野生型Endo-Siと比較して、加水分解活性が低減され、且つ、増強された糖鎖転移活性を有するため、糖鎖リモデリングにより、均一な糖鎖を有する抗体もしくは糖鎖含有分子（Fc領域含有分子を含む）を、効率よく、又は高純度で取得することが可能である。従って、糖鎖リモデリングにおいて用いる糖鎖ドナー分子量の削減も可能であるため、糖鎖リモデリングされた抗体もしくは糖鎖含有分子の製造コストの低減につながる。

図面の簡単な説明

- [0020] [図1] $[N_3-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox$ の構造式を示す。
- [図2]SGPの構造式を表す。
- [図3]Endo-Si(O)及びEndo-S(X)の、Trastuzumab(mAb1)に対する加水分解活性の経時変化を示すグラフである。X軸は反応開始後の経過時間、Y軸は糖鎖加水分解率を表す。
- [図4]Endo-Si又はEndo-Si変異酵素を用いた、抗体のN297結合糖鎖に対する加水分解反応の模式図である。
- [図5]糖鎖オキサゾリン体をドナーとして、Endo-Si又はEndo-Si変異酵素を用いた糖鎖転移反応の模式図である。

- [図6]配列番号1の配列 (E n d o - S i 塩基配列) を示す図である。
- [図7]配列番号2の配列 (E n d o - S i アミノ酸配列) を示す図である。
- [図8]配列番号3の配列 (E n d o - S i アミノ酸配列 D 2 4 1 Q) を示す図である。
- [図9]配列番号4の配列 (E n d o - S i アミノ酸配列 D 2 4 1 Q / Q 3 1 1 L) を示す図である。
- [図10]配列番号5の配列 (E n d o - S i アミノ酸配列 D 2 4 1 Q / E 3 6 0 Q) を示す図である。
- [図11]配列番号6の配列 (E n d o - S i アミノ酸配列 D 2 4 1 M) を示す図である。
- [図12]配列番号7の配列 (E n d o - S i アミノ酸配列 D 2 4 1 M / Q 3 1 1 L) を示す図である。
- [図13]配列番号8の配列 (E n d o - S i アミノ酸配列 D 2 4 1 M / E 3 6 0 Q) を示す図である。
- [図14]配列番号9の配列 (E n d o - S i アミノ酸配列 T 1 9 0 Q / D 2 4 1 Q) を示す図である。
- [図15]配列番号10の配列 (E n d o - S i アミノ酸配列 T 1 9 0 Q) を示す図である。
- [図16]配列番号11の配列 (E n d o - S i アミノ酸配列 T 1 9 0 Q / D 2 4 1 M) を示す図である。
- [図17]S G Pをドナーとして、E n d o - S i 変異酵素及び酵素Aを用いた、糖鎖転移反応の模式図である。
- [図18]E n d o - S i とE n d o S の反応温度と糖鎖加水分解率の関係を示す図である。
- [図19]E n d o - S i とE n d o S の反応p Hと糖鎖加水分解率の関係を示す図である。
- [図20]E n d o - S i 、E n d o S 、P N G a s e F の各種抗体に対する加水分解活性の比較を示す図である。

[図21] ([N₃-PEG (3)] -MSG1-) A s n-PEG (3) -N₃ をドナーとして、E n d o - S i 変異酵素及び酵素Aを用いた、糖鎖転移反応の模式図である。

[図22] ([N₃-PEG (3)]₂-SG-) A s n-PEG (3) -N₃ をドナーとして、E n d o - S i 変異酵素及び酵素Aを用いた、糖鎖転移反応の模式図である。

発明を実施するための形態

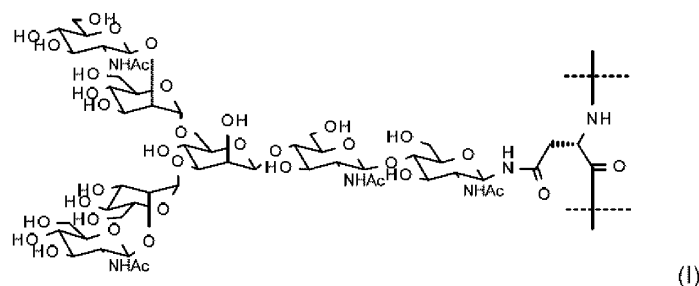
[0021] 以下に、本発明を詳細に説明する。

[0022] 本明細書において、分子中に含まれるアミノ酸の表記法は、本分野の慣例に従い、変異箇所を示す場合は野生型のアミノ酸（又は核酸）の一文字表記とその番号（例えば、241番目のA s pであれば「D241」）により表す。なお、本明細書において、アミノ酸部位への変異とは、アミノ酸を、置換、欠失、挿入又は付加させることを表し、好ましくは、アミノ酸を置換することを表す。また、変異については、野生型のアミノ酸（又は核酸）の一文字表記、その番号及び変異後のアミノ酸（又は核酸）の一文字表記（例えば、241番目のA s pがG l nに置換された変異は「D241Q」）により表す。また、変異を有する特定の変異酵素は、分子名と変異（例えば、E n d o - S i の241番目A s pがG l nに置換された変異酵素は、「E n d o - S i D241Q」）により表し、複数の変異を有する場合は、変異の間を「/」で区切る形（例えば、E n d o - S i D241Qにおいて、241番目のG l nがL e uに置換された追加変異を有する変異酵素は、「E n d o - S i D241Q/Q311L」）と表す。

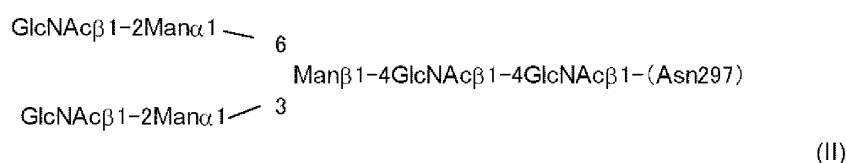
[0023] 本発明において、「N297結合糖鎖」とは、I g G重鎖の297番目のA s nの側鎖に結合するN結合型糖鎖を意味する。I g Gを断片化した場合、当該A s nを含むペプチド断片において、対応するA s nに結合する糖鎖であっても、N297結合糖鎖に含まれる。通常、動物等で産生されたI g GにおけるN297結合糖鎖は、下記式 (I)又は (II)の構造からなる基本構造を有しており、その非還元末端は、さらに化学修飾されていてもよく、例

えばガラクトース (Gal) やシアル酸 (Sia) が付加していてもよい。

[0024] [化1]



[0025] [化2]



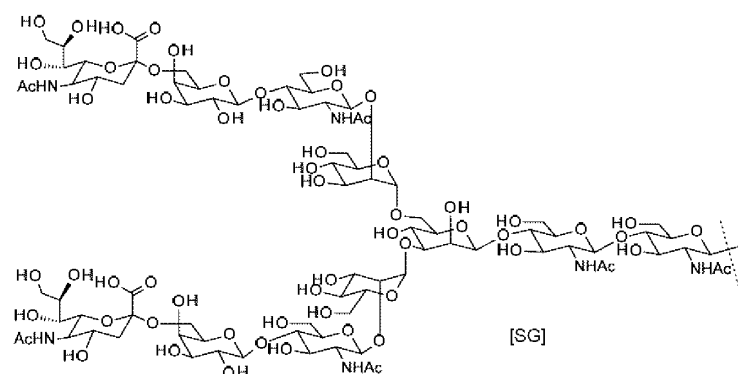
細胞が産生する IgG の N 2 9 7 結合糖鎖の多くは、この基本構造において、その還元末端の GlcNAc (コア GlcNAc)、非還元末端、分岐糖などにおいてさらに糖鎖が結合したものを含む、糖鎖構造の多様性を有している。コア GlcNAc の 6 位にはフコース (Fuc) が $\alpha 1, 6$ 結合したコアフコースを有する構造 ($(\text{Fuc}\alpha 1, 6)\text{GlcNAc}$) に修飾されている。分岐糖である Man においては、その 5 位にさらに GlcNAc を含む糖鎖が結合した 3 分岐型の糖鎖を形成している場合もある。非還元末端の GlcNAc においては、ガラクトースやシアル酸を含む糖鎖がさらに結合している場合もある。

[0026] 本発明において、シアリルグリカン (Sialyl Glycan、以下、「SG」という) とは、下記の構造式および配列式からなる基本構造を有している。

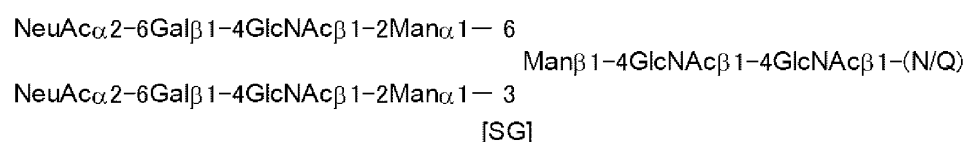
[0027] SG の代表的なものとしては、鶏卵の卵黄に含まれるシアリルグリコペプチド (Sialyl GlycoPeptide: 以下、「SGP」という) に含まれる糖鎖を例示することができる。

[0028]

[化3]



[0029] [化4]



(式中、「 $-(\text{N/Q})$ 」は、 Asn 又は Gln の側鎖と N グリコシド結合することを示す。)

SGの糖鎖部分において還元末端の GlcNAc が一つ欠損した糖鎖（以下、「SG(10)」）のみからなるジシアロオクタサッカリド（東京化成（株）製）などが市販されている。本明細書において、SG(10)の β マンノース（ $\beta\text{-Man}$ ）の分岐鎖のいずれか一方のみで非還元末端のシアル酸が欠失した糖鎖構造をMSG(9)といい、分岐鎖の1-3糖鎖のみにシアル酸を有するものをMSG1(9)、分岐鎖の1-6糖鎖のみにシアル酸を有するものをMSG2(9)、とそれぞれ表記するものとする（特許文献1、WO2019/065964）。

[0030] 本発明において、「糖鎖ドナー分子」とは、糖鎖の還元末端が活性化された GlcNAc 、好ましくは、オキサゾリン化された GlcNAc を有する糖鎖含有分子であり、多様な糖鎖構造の分子を用いることができる。活性化とは、糖アノマー位の反応性が高められた状態を指し、オキサゾリン化またはハロゲン化を含む。糖鎖ドナー分子の例としては、実施例6で使用した $[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]\text{-MSG1}(9)\text{-Ox}$ （図1）や $\text{SG}(9)\text{-Ox}$ （

オキサゾリン)、MSG1(9)-Ox、MSG2(9)-OxもしくはMSG1(9)-OxとMSG2(9)-Oxの混合物が挙げられる。

[0031] 糖鎖ドナー分子の別の態様としては、糖鎖の還元末端が活性化されていないGlcNAcを有する糖鎖含有分子、好ましくは、SGP(図2)、(SG-)Asn、(MSG1-)Asn、(MSG2-)Asnもしくは(MSG1-)Asn、(MSG2-)Asnの混合物が挙げられる。

[0032] 本発明において、特別な記載がない限り、アミノ酸の側鎖において糖鎖と連結した場合の部分構造は、側鎖部分を括弧で表示し、例えば、「(SG-)Asn」のように表記するものとする。

[0033] 糖鎖ドナー分子は、化学修飾されていてもよく、例えば、非還元末端が化学修飾されたSGP、(SG-)Asn、(MSG1-)Asn、(MSG2-)Asn、(MSG1-)Asnと(MSG2-)Asnの混合物やSG(10)-Ox、MSG1(9)-Ox、MSG2(9)-Ox又はMSG1(9)-OxとMSG2(9)-Oxの混合物等を含む。好ましくは、([N₃-PEG(3)]₂-SG(10))-Ox、[N₃-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox、[N₃-PEG(3)]-MSG2(9)-Ox、又は[N₃-PEG(3)]-MSG1(9)-Oxと[N₃-PEG(3)]-MSG2(9)-Oxの混合物、あるいは([N₃-PEG(3)]₂-SG-)Asn-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG1-)Asn-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG2-)Asn-PEG(3)-N₃、又は([N₃-PEG(3)]-MSG1-)Asn-PEG(3)-N₃と([N₃-PEG(3)]-MSG2-)Asn-PEG(3)-N₃の混合物(特許文献1、WO2019/065964)などが挙げられる。

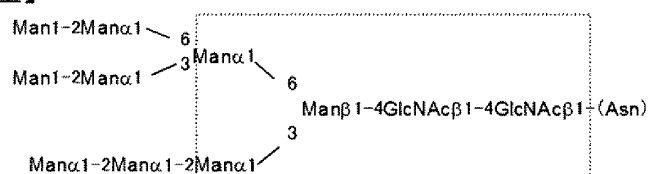
[0034] 創薬を目的とした糖鎖リモデリングに用いる場合、ヒトへ適用した際に問題の少ないヒト型糖鎖、又は、ヒト適合型糖鎖を有する糖鎖ドナーを採用することが好ましい。このような糖鎖は、ヒトの体内で抗原性を示さないことが知られている糖鎖であり、N結合型糖鎖では、ハイマンノース型、混成(

ハイブリッド) 型、複合 (コンプレックス) 型などが知られている。これら 3 つには共通の基本構造がある。ハイマンノース型は、還元末端に近い位置にあるマンノース (β マンノース) から枝分かれした 2 つの分岐鎖 (1-3 鎖、1-6 鎖) に、複数のマンノースが連続したマンノースリッチ構造を有する糖鎖である。混成型とは、還元末端に近い位置にあるマンノース (β マンノース) から枝分かれした 2 つの分岐鎖 (1-3 鎖、1-6 鎖) のうち、一方が GlcNAc を有する構造となったものである。複合型とは、還元末端に近い位置にあるマンノース (β マンノース) から枝分かれした 2 つの分岐鎖 (1-3 鎖、1-6 鎖) に GlcNAc を有する構造となっており、ガラクトースの有無、シアルの有無、さらにこれらの結合異性や位置異性を含む多彩な構造を有するものである。複合型糖鎖は 2 分岐型、3 分岐型、4 分岐型が知られている。

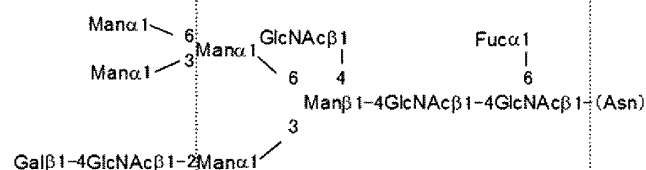
[0035] 以下に、ハイマンノース型、混成型及び複合型の構造の例を示す。

[0036] [化5]

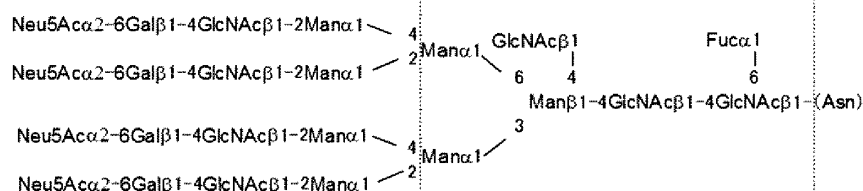
【高マンノース型】



【混成型】



【複合型】



ヒト型N結合糖鎖の種類

本発明において、「アクセプター分子」とは、非還元末端にGlcNAcを有する糖構造を含む分子であり、Endo-Si又はその変異酵素存在下で、糖鎖ドナー分子と反応させることにより、当該非還元末端のGlcNAcの4位に糖鎖ドナー分子のオキサゾリン環又は活性中間体（非特許文献9）が反応し、キトビオース構造を形成することができる。

[0037] アクセプター分子として典型的なものは、モノクローナル抗体に由来する、コアFucが結合していてもよいコアGlcNAcのみからなるN297結合糖鎖を有するIgG又はそのFc断片である。コアGlcNAcには、その由来となる抗体又はその産生方法に応じて、コアFucが結合していても良く、結合していなくても良い。アクセプター分子の由来としては様々なモノクローナル抗体又は糖鎖含有分子若しくはFc領域含有分子（Fc、重鎖から可変領域を欠失させた定常領域のみからなるCHと軽鎖の定常領域のみからなるCLと組み合わせたCLCHなど）を利用することができるが、好ましくは(Fuc α 1, 6)–GlcNAc–IgG（例えば、図4の(Fuc α 1, 6)GlcNAc–mAb1）、(Fuc α 1, 6)–GlcNAc–Fc、(Fuc α 1, 6)–GlcNAc–CLCHなどが挙げられる（特許文献1）。

[0038] 本発明において、「Endo-Si」とは、Streptococcus pneumoniaeに由来するエンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase: Endo- β -N-acetylglucosaminidase）の一種であり、配列番号1に塩基配列を示し、配列番号2にアミノ酸配列を示す。配列番号2のアミノ酸番号34～928（1～33番目のアミノ酸はシグナル配列を示す。シグナル配列の予測には、CBSが提供するツールであるSignalP-5.0を利用した。）のアミノ酸配列において、241番目のアミノ酸がAspであるアミノ酸配列からなる酵素（EC3.2.1.96、GH18）である。Endo-Siは、N結合型糖鎖（例えば、N297結合糖鎖）を特異的に認識し、加水分解活性と糖鎖転移活

性を併せ持つ。

[0039] *Endo-Si* の加水分解活性は上記の基本構造を有する N 結合型糖鎖のコアキトビオースに含まれる β 1, 4 グリコシド結合を特異的に加水分解する活性（本明細書において、特に言及が無い限り、「加水分解活性」とは、この活性を意味する。反応模式図を図 4 に示す。）である。

[0040] *Endo-Si* の糖鎖転移活性は、N297 にコア *GlcNAc*（コアフコースが付加していても、付加していなくても良い）のみを有する *Fc* 部位を含むアクセプター分子に、上記糖鎖ドナー分子（還元末端が活性化された *GlcNAc*、もしくは還元末端が活性化されていない *GlcNAc* を有する糖鎖含有分子）の還元末端をグリコシド結合させる活性（以下、「糖鎖転移活性」という。反応模式図を図 5 又は図 17 に示す。）である。

[0041] *Endo-Si* の各種抗体に対する基質特異性は、以下のとおりである。
IgG の 4 つのサブクラス全てに対して糖鎖加水分解活性を示すが、*IgA* および *IgE* に対する糖鎖加水分解活性は示さない。また、各種 N 結合型糖鎖に対する基質特異性は、以下のとおりである。ハイマンノース型糖鎖及び複合型 2 分岐糖鎖、いずれに対しても加水分解活性を示すが、ハイマンノース型糖鎖よりも複合型 2 分岐糖鎖に対する特異性が高く、中でも *G0* 糖鎖に対する加水分解活性が最も高い。さらに、シアリル糖鎖やフコシル化糖鎖に対しても加水分解活性を示すが、複合型 3 分岐糖鎖に対する加水分解活性は示さない。

[0042] なお、*G0* 糖鎖とは、非還元末端が 2 つの分岐鎖（1-3 鎖、1-6 鎖）に結合した *GlcNAc* であり、ガラクトース残基を持たない 2 分岐複合型糖鎖をいう。

[0043] 本発明の酵素は、上記の特性を有するものであれば、実施例で取得された具体的な配列の酵素に限定されるものではなく、天然から分離された酵素であっても、本発明の酵素の配列情報に基づき人為的に作製又は改変された酵素であっても良い。天然から分離する場合、その分離源とする生物種は特に限定されないが、好ましくは細菌であり、より好ましくは *Streptococcus*

occus属の細菌であり、更に好ましくはStreptococcus
iniiaeに属する細菌である。

[0044] Endo-Siの活性ドメインおよびCarbohydrate-binding module (CBM) は、結晶構造解析が行われているEndoS (B. Trastoy et al., PNAS (2014) vol 111, No. 18, pp 6714-6719) との配列比較から、それぞれ、配列番号2のアミノ酸番号106~447およびアミノ酸番号762~897の領域であると推察され、この2つが加水分解活性及び／又は転移活性と、抗体との相互作用に重要な部位であると考えられる。従って、本発明の酵素として、配列番号2のアミノ酸番号106~447及び／又はアミノ酸番号762~897に記載のアミノ酸配列を含み、好ましくは、配列番号2のアミノ酸番号106~897に記載のアミノ酸配列を含み、より好ましくは配列番号2のアミノ酸番号106~928に記載のアミノ酸配列を含み、さらに好ましくは配列番号2のアミノ酸番号34~928に記載のアミノ酸配列を含み、かつ、加水分解活性及び／又は糖鎖転移活性を示すポリペプチドが挙げられる。

[0045] <本発明の変異酵素>

本発明は、配列番号2のアミノ酸番号34~928に記載のアミノ酸配列において、241番目(D241)、190番目(T190)、311番目(Q311)及び360番目(E360)のアミノ酸からなる群より選択される1又は2以上のアミノ酸部位への変異を含むアミノ酸配列を有し、かつ、糖鎖加水分解活性及び／又は糖鎖転移活性を示すことを特徴とする、Endo-Siの変異酵素を提供し、好ましくは実施例6に示されるように、配列番号2のアミノ酸番号34~928に記載のアミノ酸配列において糖鎖転移活性に必要な領域を含有し、且つ、IgGのN297結合糖鎖に対する活性として、Endo-Si WT (以下、アミノ酸配列に変異を導入していない野生株を「WT」という)と比較して加水分解活性が低減され、糖鎖転移活性が向上していることを特徴とする、Endo-Siの変異酵素を提供

する。

[0046] 本発明のアミノ酸の置換／変異としては、上記特徴を示す置換／変異であり、好ましくは、配列番号2のT190、D241、Q311、E360から選択される少なくとも一つ又は複数のアミノ酸部位の置換／変異であり、より好ましくは、D241Q、D241M、D241A、T190Q、Q311L、E360Q、E360A、E360N、又はE360Dであり、さらに好ましくは、D241Q、D241M、T190Q、Q311L、E360Qであり、もっとも好ましくは、D241Q、D241Q/Q311L、D241Q/E360Q、D241M、D241M/Q311L、D241M/E360Q、T190Q/D241Q、T190Q、T190Q/D241Mである。なお、上記特性を示す限り、配列番号2のT190、D241、Q311、E360における置換／変異に加え、更なる置換／変異を含んでいても良い。

[0047] エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼは、加水分解活性と糖鎖転移活性を併せ持つ（以下、両方の活性を併せ持つことを「本酵素活性」を有する、という）。そのため、強い加水分解活性を保持する酵素は、糖鎖転移活性によりアクセプター分子（N297結合糖鎖としてコアGlcNAcを有する抗体もしくはそのFc領域含有分子）のコアGlcNAcに転移させた糖鎖をも基質として加水分解し、所望の糖鎖転移体を適切に取得できない場合がある。そのため、糖鎖リモデリング抗体等もしくは糖鎖修飾化合物の合成においては、糖鎖転移活性を向上させた変異酵素が有用である。本発明の変異酵素は、Endo-Si WTよりも低減された加水分解活性、及び増強された糖鎖転移活性を併せ持つことを特徴とする。

[0048] 変異酵素の糖鎖転移活性は後述の実施例6、または実施例7の方法により評価することができる。

[0049] 本発明の変異酵素が有する本酵素活性のうち、糖鎖転移活性は、Endo-Si WTの糖鎖転移活性を上回る。すなわち、pH7～8（例えば、pH7.5）、糖鎖ドナー（例えば、還元末端が活性化されたGlcNAc（

オキサゾリン化されたGlcNAc等)を含む糖鎖)がアクセプター分子の5～10等量(例えば、8等量)存在する条件における糖鎖転移率が、反応開始から1～24もしくは48時間後までのいずれかの時間点以降において、Endo-Si WTを上回る糖鎖転移率を示す。好ましくは、反応開始後24時間もしくは48時間までに糖鎖転移率が50%を超えるものであり、より好ましくは、反応開始後24時間までに糖鎖転移率が60%を超えるものであり、さらに好ましくは、反応開始後24時間までに糖鎖転移率が80%を超えるものであり、さらにより好ましくは、反応開始後24時間までに糖鎖転移率が95%を超えるものである。

[0050] 本発明の変異酵素が有する糖鎖転移活性の別の態様として、Endo-Si WTの糖鎖転移活性を上回る態様が挙げられる。すなわち、pH7～8(例えば、pH7.5)、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含む糖鎖ドナーがアクセプター分子の10～100等量(例えば、50等量)存在する条件における糖鎖転移率が、反応開始から1～48時間後までのいずれかの時間点以降において、Endo-Si WTの糖鎖転移率と同等かそれ以上の糖鎖転移率を示す。好ましくは、反応開始後24時間もしくは48時間までに糖鎖転移率が50%を超えるものであり、より好ましくは、反応開始後48時間までに糖鎖転移率が60%を超えるものであり、さらに好ましくは、反応開始後48時間までに糖鎖転移率が80%を超えるものであり、さらにより好ましくは、反応開始後48時間までに糖鎖転移率が90%を超えるものである。

[0051] 本発明の変異酵素は、配列番号2のアミノ酸番号34～928のアミノ酸配列において、D241、T190、Q311及びE360からなる群より選択される1又は2以上(好ましくは、1～3個、より好ましくは1もしくは2個)のアミノ酸部位への変異を有し、かつ、Endo-Siの糖鎖転移活性に重要な領域を保持していれば、その全長配列である必要はない。EndoSのドメイン解析から、触媒ドメイン(配列番号2のアミノ酸番号106～447)、及び/又は、CBM(配列番号2のアミノ酸番号762～8

97) が重要であることが知られており、これらを含む限り、本発明の変異酵素として使用できる。

[0052] 本発明の変異酵素は、上記「本発明のアミノ酸の置換／変異」に記載した変異を含むポリペプチドであり、具体的には、配列番号3 (Endo-Si D241Q)、配列番号4 (Endo-Si D241Q/Q311L)、配列番号5 (Endo-Si D241Q/E360Q)、配列番号6 (Endo-Si D241M)、配列番号7 (Endo-Si D241M/Q311L)、配列番号8 (Endo-Si D241M/E360Q)、配列番号9 (Endo-Si T190Q/D241Q)、配列番号10 (Endo-Si T190Q) 及び配列番号11 (Endo-Si T190Q/D241M) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。

[0053] 本発明の変異酵素のアミノ酸配列において、本酵素活性に影響しない範囲で、必須変異 (D241、T190、Q311又はE360) 以外の部位で、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は、付加していてもよい。このようなアミノ酸変異の部位としては、本酵素活性に影響しない限り、全部位を選択しても良いが、好ましくは、241番目、190番目、311番目、又は、360番目以外のアミノ酸、より好ましくは触媒ドメイン (配列番号2のアミノ酸番号106～447)、及び、CBM (配列番号2のアミノ酸番号762～897) 以外の部位であり、更に好ましくは、配列番号2のアミノ酸番号34～105又はアミノ酸番号898～928の領域に含まれる部位である。

[0054] 本発明において、数個とは、30個もしくは20個以下であり、好ましくは10個以下であり、さらに好ましくは5個以下であり、最も好ましくは4個、3個、2個又は1個である。

[0055] 本発明において、変異による置換後のアミノ酸は、最終的に得られる変異酵素が本酵素活性を有する限り特に限定されるものではなく、天然に存在するアミノ酸、人工的に合成されたアミノ酸、それらの修飾アミノ酸等、様々

なアミノ酸を採用することができるが、好ましくは天然に存在するアミノ酸であり、より好ましくは天然に存在するL-アミノ酸であり、さらに好ましくは必須アミノ酸である。

[0056] 本発明の変異酵素のアミノ酸配列において、本酵素活性に影響しない範囲で、必須変異（D241、T190、Q311又はE360）のアミノ酸以外のアミノ酸配列に対して少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%、96%、97%、98%もしくは99%以上の相同性もしくは同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0057] 二種類のアミノ酸配列間の同一性あるいは相同性は、二種類のアミノ酸配列間の同一性あるいは相同性は、Blast algorithm version 2.2.2 Blast algorithm version 2.2.2 (Altschul, SF, et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25, 3389-3402) のデフォルトパラメーターを使用することによって決定することができる。Blast algorithmは、例えば、インターネットで<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>にアクセスすることによっても使用することができる。

[0058] <遺伝子、宿主細胞、酵素産生方法>

本発明は、さらに上記のEndo-Si（配列番号1）またはEndo-Si変異酵素をコードする組み換え遺伝子、当該組み換え遺伝子を含むプラスミドや発現ベクター等の遺伝子構築物、当該遺伝子構築物により形質転換された宿主細胞、当該宿主細胞の培養物から本発明のEndo-SiまたはEndo-Si変異酵素を回収する工程を含む、本発明の酵素の製造方法などを提供する。これらの組み換え遺伝子、遺伝子構築物、宿主細胞等は、本発明の変異酵素のアミノ酸配列に基づき、公知の遺伝子工学的手法に従って作製することができる。大腸菌用のEndo-Siの塩基配列を配列番号16に示す。

[0059] 本発明の酵素をコードする遺伝子の導入により形質転換された宿主細胞（動物細胞、植物細胞、大腸菌、酵母など、タンパク質産生に通常用いられる細胞等を適宜選択できる）は、細胞の種類に応じて適切な条件下で培養され、その培養物から本発明の酵素を回収することができる。酵素の回収は、当該酵素の物性を利用して、通常の前製手法を適宜組み合わせるで行うが、簡便に回収するために、予めHisタグ、GSTタグ等のタグペプチドを酵素に連結させた形で発現させるように、遺伝子構築物を設計しておくことにより、当該タグペプチドの親和性を利用した回収を行うことができる。タグペプチドは、精製後に除去してもよいが、酵素活性に影響ない場合は、タグペプチドを連結させたままの酵素を、糖鎖リモデリング等の反応に使用してもよい。本発明の酵素には、このようなタグペプチドが連結したアミノ酸配列を有する酵素を含む。

[0060] <糖鎖リモデリング>

本発明は、本発明のEndo-SiまたはEndo-Si変異酵素を使用した、糖タンパク質の糖鎖の糖鎖リモデリング方法、及び、当該糖鎖リモデリングにより製造された実質的に均一な構造からなる糖鎖を有する糖タンパク質を提供する。また、当該糖鎖リモデリングにより実質的に均一な構造からなる糖鎖を有する糖タンパク質を製造する方法を提供する。

[0061] 本発明の一実施態様は、本発明のEndo-SiまたはEndo-Si変異酵素を使用した、抗体又はそのFc領域含有分子におけるN297結合を含むN結合型糖鎖の糖鎖リモデリング方法、及び、当該糖鎖リモデリングにより製造された実質的に均一な構造からなるN297結合を含むN結合型糖鎖を有する糖たんぱく質、好ましくは抗体又はFc領域含有分子、を提供する。また、当該糖鎖リモデリングにより実質的に均一な構造からなるN297結合を含むN結合型糖鎖を有する糖たんぱく質、好ましくは抗体又はFc領域含有分子を製造する方法を提供する。抗体は好ましくはIgGである。以下、IgGについて説明する。なお、本発明において糖タンパク質とは、動植物の組織、真核微生物の細胞膜や細胞壁などに存在する、タンパク質の

アミノ酸配列中に、O結合型糖鎖、または、N結合型糖鎖が少なくとも一つ以上結合しているタンパク質であり、天然由来であっても、合成したのもでも良く、例えば、モノクローナル抗体のIgG又はIgGのFc断片や定常領域のみからなるCLCH（特許文献1、WO2018/003983）等のFc領域含有分子等をいう。

[0062] 「糖鎖リモデリング」とは、まず、特定の糖タンパク質、例えば、モノクローナル抗体のIgG又はIgGのFc断片や定常領域のみからなるCLCH等のFc領域含有分子のN297結合糖鎖をコアGlcNAc（コアフコースが付加していてもよい）を残して切除したアクセプター分子を作製し、次いで、当該アクセプター分子のコアGlcNAcに対して、本発明のEndo-Si変異酵素の糖鎖転移活性を利用して、糖鎖ドナーに由来する糖鎖を転移させることにより、N297結合糖鎖が糖鎖ドナーに由来する均一な糖鎖構造であるIgG又はそのFc領域含有分子を製造する方法を意味する。

[0063] 糖鎖リモデリングに用いられるIgG又はFc領域含有分子は、好ましくは同一のアミノ酸配列からなるIgG重鎖に由来し、N297結合糖鎖を有する形で産生されたものであればよい。その産生方法は限定されるものではなく、通常知られたモノクローナル抗体の生産方法により産生されたIgG、IgGのCLCH、又は、それを酵素処理して得られたFc断片などを利用することができる。また、このようなIgG又はFc断片は、異なる生産方法や異なるロットで得られたサンプルの混合物を採用してもよい。

[0064] 糖鎖リモデリングに用いるアクセプター分子の調製方法としては、上述のIgG又はFc領域含有分子を、N297結合糖鎖のコアキトビオース構造におけるGlcNAc間の1,4-グリコシド結合（GlcNAc β 1-4GlcNAc）を特異的に加水分解する活性を保持したENGaseで処理することにより調製することができる。この場合、ENGaseとしては、Endo-Si WT、Endo-A、Endo-D、Endo-E、Endo-F3、Endo-H、EndoS、EndoS2をはじめ様々なもの

を採用することができる。

[0065] 糖鎖リモデリングに用いる糖鎖ドナー分子としては、様々な糖鎖構造のものを採用することができるが、リモデリング後の抗体を抗体医薬とすることを目的とした場合、ヒトが保有する糖鎖構造と類似した、又は、同一の、ヒト型糖鎖、又は、ヒト適合型糖鎖構造を有する糖鎖ドナーを採用することが好ましい。

[0066] このような糖鎖ドナー分子の代表的なものとして、上記のN結合型糖鎖の基本構造において、コアGlcNAcが除かれ、還元末端から2番目のGlcNAcが活性化された分子を挙げることができる。例えば、SG(10)-Oxや([N₃-PEG(3)]₂-SG(10))-Ox、[N₃-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox、[N₃-PEG(3)]-MSG2(9)-Ox、又は[N₃-PEG(3)]-MSG1(9)-Oxと[N₃-PEG(3)]-MSG2(9)-Oxの混合物が挙げられる(WO2019/065964)。

[0067] 糖鎖ドナー分子の他の態様として、還元末端から2番目のGlcNAcが活性化されていない分子を挙げることができる。例えば、([N₃-PEG(3)]₂-SG)-Asn-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG1)-Asn-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG2)-Asn-PEG(3)-N₃、又は([N₃-PEG(3)]-MSG1)-Asn-PEG(3)-N₃と([N₃-PEG(3)]-MSG2)-Asn-PEG(3)-N₃の混合物(特許文献1、WO2019/065964)が挙げられる。

[0068] この際、糖鎖ドナー分子の複合型糖鎖を基質とするがN297結合糖鎖を基質としないエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(酵素A)と本発明のEndo-SiまたはEndo-Si変異酵素、好ましくはEndo-Si変異酵素を共存させることで、ドナー分子の糖鎖をアクセプター分子である糖鎖を切断したIgG又はFc領域含有分子のコアGlcNAc残基に結合させる。ここで用いる酵素Aが糖鎖ドナーであるSGPからGlcN

Acを有するアクセプターへの糖鎖転移活性を持つ場合に、酵素Aはワンポット法において高い糖鎖転移効率を示す。すなわち、酵素Aとしては、還元末端が活性化されていない糖鎖ドナー分子の複合型糖鎖を基質とするがN297結合糖鎖を基質としないエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼの中から、GlcNAcを有するアクセプターへの糖鎖転移活性を指標として、選択することができる。N297結合糖鎖を基質としないエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼとしては、Endo-M、Endo-Rp、Endo-Om、Endo-CC、又はそれらの加水分解活性を低下させた変異酵素が挙げられる。加水分解活性を低下させた変異酵素としては、公知のEndo-Rp N172Q、Endo-Rp N172H（特許文献3）、Endo-M N175Q（Umekawa M. et al., J Biol Chem. 2010, 285, 511-521）、Endo-CC N180H又はEndo-Om N194Q（Chiba Y. Kagaku to Seibutsu 2015, 53, 236-244）等が挙げられる。好ましくは、Endo-Rp N172Q、Endo-Rp N172H、Endo-Rp N172A、Endo-Rp N172C、Endo-Rp N172D、Endo-Rp N172E、Endo-Rp N172G、Endo-Rp N172I、Endo-Rp N172L、Endo-Rp N172M、Endo-Rp N172P、Endo-Rp N172S、Endo-Rp N172T、Endo-Rp N172Vが挙げられる。また、2つのアミノ酸が置換された変異酵素として、Endo-Rp W278F/S216V、Endo-Rp W278F/N246D、Endo-Rp W278F/D276N、Endo-Rp W278F/A310Dが挙げられる。さらに、3つのアミノ酸が置換された変異酵素として、Endo-Rp W278F/N172D/F307Y、Endo-Rp W278F/N172D/F307H、Endo-Rp W278F/N172D/A310D、Endo-Rp W214F/F307Y/L306Iが挙げられる。

[0069] E n d o - R p の変異酵素のアミノ酸配列を配列番号 1 7 ~ 4 3 に、E n d o - M のアミノ酸配列を配列番号 4 4 に、E n d o - O m のアミノ酸配列を配列番号 4 5 に、E n d o - C C のアミノ酸配列を配列番号 4 6 に示す。

[0070] 本発明の E n d o - S i 変異酵素と酵素 A との組合せとしては、例えば、表 1 及び表 2 の組合せが挙げられる。

[0071]

[表1]

Endo-Si 変異酵素	酵素 A(Endo-Rp 変異酵素)
D241Q	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y
	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
D241M	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y

	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
D241A	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y
	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
T190Q	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y

	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
Q311L	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y
	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
E360Q	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y

	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
E360A	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y
	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
E360N	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y

	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
E360D	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y
	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
D241Q/Q311L	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y

	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
D241Q/E360Q	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y
	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
D241M/Q311L	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y

	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
D241M/E360Q	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y
	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
T190Q/D241Q	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y

	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I
T190Q/D241M	N172Q
	N172H
	N172A
	N172C
	N172D
	N172E
	N172G
	N172I
	N172L
	N172M
	N172P
	N172S
	N172T
	N172V
	W278F/S216V
	W278F/N246D
	W278F/D276N
	W278F/A310D
	W278F/N172D/F307Y
	W278F/N172D/F307H
	W278F/N172D/A310D
	W214F/F307Y/L306I

[0072]

[表2]

Endo-Si 変異酵素	酵素 A(他の変異酵素)
D241Q	Endo-M N175Q
D241M	
D241A	
T190Q	
Q311L	
E360Q	
E360A	
E360N	
E360D	
D241Q/Q311L	
D241Q/E360Q	
D241M/Q311L	
D241M/E360Q	
T190Q/D241Q	
T190Q/D241M	
D241Q	Endo-CC N180H
D241M	
D241A	
T190Q	
Q311L	
E360Q	
E360A	
E360N	
E360D	
D241Q/Q311L	
D241Q/E360Q	
D241M/Q311L	
D241M/E360Q	
T190Q/D241Q	
T190Q/D241M	
D241Q	Endo-Om N194Q
D241M	
D241A	
T190Q	
Q311L	
E360Q	
E360A	
E360N	
E360D	
D241Q/Q311L	
D241Q/E360Q	

D241M/Q311L	
D241M/E360Q	
T190Q/D241Q	
T190Q/D241M	

糖鎖リモデリングにより実質的に均一な構造からなる糖鎖を有する糖タンパク質を製造する観点から、好ましくは本発明のE n d o − S i 変異酵素と酵素 A との組合せとしては表 3 の組合せが挙げられる。

[0073] [表3]

Endo-Si 変異酵素	酵素 A
D241Q	Endo-Rp N172H
D241M	
D241A	
T190Q	
Q311L	
E360Q	
E360A	
E360N	
E360D	
D241Q/Q311L	
D241Q/E360Q	
D241M/Q311L	
D241M/E360Q	
T190Q/D241Q	
T190Q/D241M	
D241Q	Endo-M N175Q
D241M	
T190Q	
D241Q/Q311L	
D241Q/E360Q	
D241M/Q311L	
D241M/E360Q	
T190Q/D241Q	
T190Q/D241M	

[0074] 本発明の糖鎖転移活性を示すポリペプチド及び還元末端が活性化されていない糖鎖ドナー分子の複合型糖鎖を基質とするがN 2 9 7 結合糖鎖を基質としないエンドー β - N - アセチルグルコサミニダーゼ（酵素 A ）の存在下で

、N297結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコアGlcNAcを有する抗体若しくはそのFc領域含有分子であるアクセプター分子を、還元末端が活性化されていない糖鎖を含む糖鎖ドナー分子と反応させればよい(図17)。

[0075] 糖鎖リモデリングにおけるアクセプター分子調製のための加水分解反応の反応条件は他の酵素において知られている条件に準じて適宜選択することができる。また酵素活性、抗体の性質、精製工程における回収率、作業時間等も考慮し選択することができる。反応は緩衝液中で行うが、クエン酸緩衝液(pH3.5~5.5)、酢酸緩衝液(pH4.5~6.0)、リン酸緩衝液(pH6.0~7.5)、MOPS-NaOH緩衝液(pH6.5~8.0)、トリス塩酸(Tris-HCl)緩衝液(pH7.0~9.0)など通常の酵素反応で用いられる緩衝液から適宜選ぶことが可能である。好ましくは、リン酸緩衝液(pH6.0~7.5)、またはトリス塩酸緩衝液(pH7.0~9.0)である。反応液には、酵素を安定化させる目的で、酵素反応を阻害しない添加剤を加えてもよいが、加えなくてもよい。

[0076] 反応温度は、4℃から50℃の間で、適宜選択できるが、好ましくは、15℃~45℃であり、より好ましくは18℃~40℃であり、より好ましくは20℃~35℃である。

[0077] また、Endo-Siの加水分解反応の反応pHは、pH5.8~9.5の間で、適宜選択できるが、好ましくは、pH6.2~pH8.0、より好ましくはpH6.5からpH7.5である。

[0078] 反応時間は、10分から96時間の間で、適宜選択できるが、好ましくは、0.5時間~80時間であり、より好ましくは、1時間~60時間、より好ましくは8時間~48時間、より好ましくは12~24時間であり、反応液の少量を経時的に採取し、加水分解の進行度を確認しながら反応の終了を判断してもよい。一般に、糖鎖加水分解反応の進行度は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、全自動電気泳動システム、あるいは液体クロマトグラフィ質量分析(LC-MS)な

どによりモニタリングすることができる。本特許では、市販抗体あるいは糖鎖リモデリング抗体を重鎖と軽鎖にフラグメント化した後、全自動電気泳動システムを用いて、N297結合糖鎖が付加している重鎖側のみ保持時間が変化することで確認した。

[0079] 糖鎖リモデリングにおいて還元末端が活性化されたGlcNAcを糖鎖ドナー（オキサゾリン化されたGlcNAc等）もしくは活性化されていないGlcNAcを糖鎖ドナーとして用いる糖鎖転移反応の反応条件は、他の酵素において知られている条件に準じて適宜選択することができる（特許文献1、WO2019/065964等）。

[0080] 反応は、緩衝液中で行うが、還元末端が活性化された、もしくは活性化されていないGlcNAcを糖鎖ドナーの分解を促進しないものが望ましく、リン酸緩衝液（pH6.0～7.5）、MOPS-NaOH緩衝液（pH6.5～8.0）、トリス塩酸緩衝液（pH7.0～9.0）などから適宜選ぶことが可能である。好ましくは、トリス塩酸緩衝液（pH7.0～9.0）である。酵素を安定化させる目的で、反応液中に酵素反応を阻害しない添加剤を加えてもよいが、加えなくてもよい。

[0081] 反応温度は、4℃から50℃の間で、適宜選択できるが、15℃～45℃であり、より好ましくは20℃～40℃であり、より好ましくは25℃～40℃である。

[0082] また、Endo-Siの加水分解反応の反応pHは、pH5.8～9.5の間で、適宜選択できるが、好ましくは、pH6.2～pH8.0、より好ましくはpH6.5からpH7.5である。

[0083] 反応時間は、10分から96時間の間で、適宜選択できるが、好ましくは、0.5時間～80時間であり、より好ましくは、2時間～70時間、より好ましくは12時間～60時間、より好ましくは16～48時間であり、より好ましくは16～28時間であり、反応液の少量を経時的に採取し、糖鎖転移反応の進行度を確認しながら反応の終了を判断してもよい。一般に、糖鎖転移反応の進行度は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル

電気泳動（SDS-PAGE）、全自動電気泳動システム、あるいは液体クロマトグラフィ質量分析（LC-MS）などによりモニタリングすることができる。本特許では、市販抗体あるいは糖鎖リモデリング抗体を重鎖と軽鎖にフラグメント化した後、全自動電気泳動システムを用いて、N297結合糖鎖が付加している重鎖側のみ保持時間が変化することで確認した。

[0084] また、糖鎖リモデリングを、N297結合糖鎖のコアキトビオース構造におけるGlcNAc間の1, 4-グリコシド結合（GlcNAc β 1-4GlcNAc）を特異的に加水分解する活性を保持したENGase及び上記の酵素Aの両方を用いて、糖鎖ドナー分子の糖鎖をアクセプター分子であるN297結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコアGlcNAcを有する抗体若しくはそのFc領域含有分子に直接転移するワンポット法で行うこともできる。N297結合糖鎖のコアキトビオース構造におけるGlcNAc間の1, 4-グリコシド結合（GlcNAc β 1-4GlcNAc）を特異的に加水分解する活性を保持したENGaseとしては、上記のEndo-Siの変異酵素が好ましく、酵素Aとしては、上記の加水分解活性を低下させたEndo-Rpの変異酵素が好ましい。ワンポット法において、糖鎖ドナー分子として、例えば、非還元末端が化学修飾されたSGP、（SG-）Asn、（MSG1-）Asn、（MSG2-）Asn、（MSG1-）Asnと（MSG2-）Asnの混合物やSG（10）-Ox、MSG1（9）-Ox、MSG2（9）-Ox又はMSG1（9）-OxとMSG2（9）-Oxの混合物等を含む。好ましくは、（[N₃-PEG（3）]₂-SG（10））-Ox、[N₃-PEG（3）]-MSG1（9）-Ox、[N₃-PEG（3）]-MSG2（9）-Ox、又は[N₃-PEG（3）]-MSG1（9）-Oxと[N₃-PEG（3）]-MSG2（9）-Oxの混合物、あるいは（[N₃-PEG（3）]₂-SG-）Asn-PEG（3）-N₃、（[N₃-PEG（3）]-MSG1-）Asn-PEG（3）-N₃、（[N₃-PEG（3）]-MSG2-）Asn-PEG（3）-N₃、又は（[N₃-PEG（3）]-MSG1-）Asn-PEG（3）-N₃

と ([N₃-PEG (3)] -MSG2-) Asn-PEG (3) -N₃ の混合物 (特許文献1、WO2019/065964) 等を用いることができる。

[0085] 糖鎖リモデリング方法で製造された糖タンパク質 (抗体又はFc領域含有分子) は更に化学的に若しくは生化学的に修飾することができる。例えば、アジド基 (N₃-) は、(ヘテロ) シクロアルキニル基 (例えば、DBCO (Dibenzocyclooctyne) 等) 等のアルキン構造と反応させることにより、1, 2, 3-トリアゾール環を形成する (SPAAC (strain-promoted alkyne azide cycloaddition: Agard NJ, et al., J Am Chem Soc. 2004, 126, 46, 15046-15047))。従って、上記アジド基 (N₃-) を有するドナー分子を用いて得られた糖鎖リモデリング抗体を、(ヘテロ) シクロアルキニル基を有し、かつ、所望の活性を有する分子 (薬学的に活性な化合物 (例えば、化学療法剤、分子標的薬、免疫活性化剤 (例えば、STINGアゴニスト (WO2020/050406、WO2014/099824、WO2014/179335、WO2014/189805、WO2014/189806、WO2015/074145、WO2015/185565、WO2016/096714、WO2016/012305、WO2016/145102、WO2017/027646、WO2017/027645、WO2017/075477、WO2017/093933、WO2017/100305、WO2017/123669、WO2017/161349、WO2017/175147、WO2017/175156、WO2018/009466、WO2018/045204、WO2018/060323、WO2018/067423、WO2018/065360、WO2014/093936、WO2018/009648、WO2018/100558)、TLRアゴニスト、A2ARアンタゴニスト、IDO阻害剤、CTLA-4、LAG-3及びPD-1経路のアンタゴニスト、チェックポイント阻害剤、血管内皮増

殖因子（VEGF）受容体阻害剤、スムーズン（smoothen）阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、レチノイド及び抗がんワクチン、アジュバント、脂質、リボソーム、毒素、抗菌剤、抗ウイルス剤、診断用薬剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、抗原、ビタミン、ホルモン等）と反応させることで、更に修飾された所望の活性を有する抗体（例えば、抗体-薬物コンジュゲート等）を得ることができる。化学療法剤若しくは毒素として、カンプトテシン（例えば、WO2014/057687）、ピロロベンゾジアゼピン（例えば、WO2013/173496、WO2014/130879、WO2017/004330、WO2017/004025、WO2017/020972、WO2016/036804、WO2015/095124、WO2015/052322、WO2015/052534、WO2016/011519、WO2015/052321、WO2015/031693、WO2011/130613、WO2019/065964）、ドキソルピシン、オーリスタチン、タキサンもしくはその誘導体を挙げることができる。

[0086] 上記アジド基（N₃-）を有するドナー分子として、例えば、WO2020/050406やWO2019/065964に記載の薬物リンカーを挙げることができる。例えば、N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[({[(11'S, 11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{[(11aS)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド、N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6

H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N
 - [4- ({ [(1 1' S, 1 1' a S) -1 1' -ヒドロキシ-7' -メ
 トキシ-8' - (3- { [(1 1 a S) -7-メトキシ-2- (4-メトキ
 シフェニル) -5-オキソ-5, 1 0, 1 1, 1 1 a-テトラヒドロ-1 H
 -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ
 プロボキシ) -5' -オキソ-1 1', 1 1' a-ジヒドロ-1' H, 3'
 H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4]
 ベンゾジアゼピン] -1 0' (5' H) -カルボニル] オキシ) メチル) フ
 ェニル] -L-アラニンアミド、N- [4- (1 1, 1 2-ジデヒドロジベ
 ンゾ [b, f] アゾシン-5 (6 H) -イル) -4-オキソブタノイル] グ
 リシルグリシル-L-バリル-N- {4- [({ [(1 1' S, 1 1 a' S
) -1 1' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- { [(1 1 a'
 S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5', 1 1 a' -ジヒドロ-1' H
 -スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベ
 ンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ) ペンチル) オキシ] -5' -オキ
 ソ-1 1', 1 1 a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1,
 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -1 0' (5'
 H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミ
 ド、N- [4- (1 1, 1 2-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5
 (6 H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル
 -N- {4- [({ [(1 1' S, 1 1 a' S) -1 1' -ヒドロキシ-7'
 ' -メトキシ-8' - [(5- { [(1 1 a' S) -7' -メトキシ-5'
 -オキソ-5', 1 0', 1 1', 1 1 a' -テトラヒドロ-1' H-スピ
 ロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジ
 アゼピン] -8' -イル] オキシ) ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-1
 1', 1 1 a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -
 ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -1 0' (5' H) -
 イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド、 (

ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) N- [4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N- [(2- {9- [(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) -15-フルオロ-16-ヒドロキシ-2, 10-ジオキソ-2, 10-ジスルフィド-14- (6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [c d] アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン-7-イル) -6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル} エトキシ) メチル] グリシンアミドを挙げることができる。

実施例

- [0087] 以下、実施例を用いて、本発明を具体的に説明する。実施例に示されたものは、本発明の実施形態の一例であり、本発明はこれに限定されるものではない。
- [0088] 本明細書に記載されているタンパク質濃度は、超微量分光光度計 Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific 製) あるいは Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific 製) を用いて定量した。
- [0089] 実施例中の [N3-PEG (3)] -MSG1 (9) -Ox は、図1の化合物を示す。SGP は、図2の化合物を示す。mAb1 は、市販の Trastuzumab (中外製薬から購入) を示す。(Fucα1, 6) GlcNAc-mAb1 は、Trastuzumab の糖鎖加水分解体を示す。mAb2 は、WO2019065964 の実施例136に記載された方法で作製した抗体を示す。mAb2 の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を配列番号12及び配列番号13に示した。(Fucα1, 6) GlcNAc-mAb2 は、WO2019/065964 の実施例61-工程1に記載された方法で作製した糖鎖加水分解体 (Fucα1, 6) GlcNAc-抗CLDN6抗体 (

H1L1)を示す。

[0090] 糖鎖加水分解、及び糖鎖転移反応の進行具合をタンパク質のゲル電気泳動法を用いて確認した(特許文献4、非特許文献8)。タンパク質の全自動電気泳動システムとして、装置にはLabChip GX II (PerkinElmer製)、試薬はProtein Express LabChipおよびProtein Express Reagent Kit (PerkinElmer製)を用いた。

[0091] <実施例1> S. *iniae*由来エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼの取得

以下の方法により、S. *iniae* S101002株からエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼの遺伝子配列を取得した。

[0092] まず、S. *iniae* S101002株ホルマリン不活化菌体(日本株、共立製薬株式会社より購入)より、ゲノムDNAを取得した。0.1% (w/v)ホルマリン溶液1 mLを遠心(6,000 rpm、10 min、4℃)し、沈殿を滅菌水1 mLで洗浄した。再度同条件で遠心し、沈殿をInstaGene DNA 精製マトリックス (Bio-Rad製) 200 μLに懸濁した。この懸濁液を56℃で30分、その後99℃で8分間、熱処理し、遠心(12,000 rpm、10 min、4℃)し、得られた上清をDNA抽出液として使用した。

[0093] DNA抽出液を鋳型に、プライマー1(配列番号14)およびプライマー2(配列番号15)、およびPrimeSTAR Max DNA Polymerase(タカラバイオ製)を用いてエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼをコードする遺伝子を増幅し、配列を解析した。この遺伝子は終止コドンを含めて2787塩基(配列番号1)からなり、928アミノ酸残基(配列番号2)からなる分子量104,644のタンパク質をコードしており、このタンパク質をEndo-Siと命名した。

[0094] <実施例2> 大腸菌を用いたEndo-Siの発現

実施例1で得たエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子を元

にC末端に6×Hisタグ付加した大腸菌の異種発現用に最適化した核酸配列（配列番号16）を設計し、ユーロフィンジェノミクス社で人工合成遺伝子を作製した。これをpET24b(+)ベクターにクローニングし、E. coli BL21(DE3)に形質転換した。形質転換後の菌液を12 mLコニカルチューブ中の2 mL LB培地(1% (w/v) Tryptone、0.5% (w/v) Yeast extract、0.5% (w/v) NaCl、50 µg/mL Kanamycin)に接種し、37℃で一晩振とう培養を行った(600 rpm, O/N)。この前培養液1.2 mLを500 mLバッフル付きフラスコ中の100 mL TB培地(1.2% (w/v) Tryptone、2.4% (w/v) Yeast extract、0.94% (w/v) K₂HPO₄、0.22% (w/v) KH₂PO₄、50 µg/mL Kanamycin、0.01% (w/v) anti foam 204、2 mM MgSO₄)に植菌し、37℃で振とう培養を開始した(210 rpm)。37℃で1.5時間培養した後にインキュベーターの温度を16℃に下げて1時間培養を継続した。培養液の温度が16℃に下がったことを確認した後に、終濃度0.2 mMとなるようにIPTGを添加し、引き続き24時間培養した。培養終了後に遠心分離により集菌した。

[0095] 集菌した菌体を5 mLのbinding buffer(50 mM HEPES(pH 8.0)、0.5 M NaCl、20 mM Imidazole、5% (w/v) Glycerol)に懸濁し、超音波破碎と遠心分離を行った上清を、Ni Sepharose 6 Fast Flow(GEヘルスケア製)で精製した。収量(A₂₈₀、吸光係数換算)は8.43 mg/100 mL brothであった。

[0096] <実施例3> Endo-Siの抗体糖鎖に対する加水分解活性

実施例2で取得した酵素について、以下の方法により加水分解活性を測定した。この際、EndoSを比較対象に用いた。

[0097] mAb1 60 mgを滅菌水5 mLに溶解し、ピバスピン20(30, 0

0.0 M WCO、PES、ザルトリウス製)で濃縮しながら50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に置換した。

[0098] この mAb 1 0.1 mg、および10 ngの酵素を含む反応液(総容量 50 μ L)を調製し、37℃でインキュベートした。反応0.5時間、1時間、および2時間の反応液をサンプリングし、上述のタンパク質の全自動電気泳動システムで分析した。得られたクロマトグラムより、未反応物と加水分解体が分離したピークとして確認される。未反応物と加水分解体のピーク面積比から糖鎖加水分解率を、以下の算出式により算出した。

[0099] 糖鎖加水分解率 (%) = $\left[\frac{[(\text{Fuc}\alpha 1, 6)\text{GlcNAc}-\text{mAb 1 由来のH鎖のピーク面積}]}{[\text{mAb 1 由来のH鎖ピーク面積}] + [(\text{Fuc}\alpha 1, 6)\text{GlcNAc}-\text{mAb 1 由来のH鎖のピーク面積}]} \right] \times 100$

反応収率の経時変化を図3に示す。0.5時間後の糖鎖加水分解率はEndo-Siが57.4%、EndoSが41.8%であり、Endo-SiはEndoSよりも強い加水分解活性を示した。

[0100] <実施例4>Endo-Siの反応条件の検討

Endo-Siの反応温度およびpHを検討した。

(4-1) Endo-Siの反応温度の評価

Endo-SiとEndoSの各温度における糖鎖加水分解率は、次のように測定した。0.1 mg mAb1、および10 ng Endo-Si WTまたはEndoS WTを含む50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 50 μ Lを調製し、27、29、31、35、37、40、43、46、48、および50℃の各温度でインキュベートした。反応0.5時間の反応液をサンプリングし、上述の方法で糖鎖加水分解率を算出した。

[0101] 結果を図18に示す。Endo-Siは、加水分解反応における至適温度(酵素が良好に機能する温度)が、25℃~45℃の範囲、より良好には30℃~42℃の範囲、特に37℃付近の35℃~39℃で良好な加水分解性を示し、また、各温度における加水分解活性がEndoSよりも高いことが

確認された。

[0102] (4-2) Endo-Si の反応 pH の評価

Endo-Si と EndoS の各 pH における糖鎖加水分解率は、次のよう次のように測定した。0.1 mg mAb1、および 10 ng Endo-Si WT または EndoS WT を含む 50 mM クエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0 または 5.5)、またはリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0、6.5、または 7.0)、またはトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5、8.0、8.5、または 9.0) 50 μ L を調製し、37℃でインキュベートした。反応 0.5 時間の反応液をサンプリングし、上述の方法で糖鎖加水分解率を算出した。

[0103] 結果を図 19 に示す。Endo-Si は、加水分解反応における至適 pH (酵素が良好に機能する pH) が pH 6.3~9.0 の範囲であり、さらに好ましくは pH 6.7~8.8 の範囲であり、特に pH 7.5 付近の pH 7.2~8.0 で良好な加水分解性を示した。Endo-Si の方が EndoS に比べ pH 6.7 付近以上の pH 条件での活性が高いことが確認された。

[0104] <実施例 5> Endo-Si の基質特異性

(5-1) 各種抗体における Endo-Si の基質特異性評価

Endo-Si、EndoS、PNGase F の各種抗体に対する加水分解活性は次のように測定した。10 μ g の各種基質、および 1 μ g Endo-Si WT を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 50 μ L を調製し、37℃でインキュベートした。基質にはヒト IgG1-4、IgA、および IgE (全てシグマアルドリッチ製) を使用した。コントロールとして、1 μ g EndoS WT および 500 U PNGase F PRIME (N-zyme scientifics 製) を用いた。2 時間後に反応液をサンプリングし、上述のタンパク質の全自動電気泳動システムで分析した。

[0105] 結果を図 20 に示す。酵素の添加により糖鎖が加水分解された場合は、添加しない場合と比較してタンパク質のバンドが低分子量側にシフトする。実

験の結果、Endo-Si WTはIgGの4つのサブクラス全てに対して活性を示した。一方で、IgAおよびIgEに対する加水分解活性は示さなかった。コントロールに用いたEndoS WTにおいても、同様の基質特異性を示すことが確認された。

[0106] (5-2) 各種糖鎖におけるEndo-Siの基質特異性評価

各種糖鎖におけるEndo-Siの基質特異性は次のように測定した。5 pmolの各種2-ABラベル化糖鎖(Agilent Technologies製)、および20 μg Endo-Si WTを含む50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 10 μLを調製した。37℃で24時間インキュベートし、その後95℃で5分間処理することで反応を停止した。反応液を以下の条件でHPLC分析した。

[0107] [HPLC分析条件]

HPLC装置: 1200 Infinity LC (Agilent Technologies製)

カラム: ACQUITY UPLC Glycan Amide 130 Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm (Waters製)

カラム温度: 40℃

検出器: 蛍光検出器RF-20Axs (島津製作所製)

移動相A: H₂O + 0.1% HCOOH

移動相B: アセトニトリル + 0.1% HCOOH

グラジエント(移動相B%): 90%(0分)、40%(25分)

流速: 0.2 mL/min

[0108] 基質およびその加水分解物であるGlcNAc-2ABのピーク面積比から、酵素活性を算出した。G0糖鎖に対する活性を100%とした場合、各種糖鎖に対する相対活性を表4に示す。Endo-Siは、ハイマンノース型糖鎖及び複合型2分岐糖鎖、いずれに対しても活性を示したが、ハイマンノース型糖鎖よりも複合型2分岐糖鎖に対する特異性が高く、中でもG0糖鎖に対する活性が最も高かった。シアリル糖鎖やフコシル化糖鎖に対して

も活性を示すが、一方で複合型 3 分岐糖鎖に対する活性は示さなかった。

[表 4] 各種糖鎖における E n d o - S i の加水分解活性

[0109] [表4]

基質	構造	相対活性	基質	構造	相対活性
2-AB Man3		7.2%	2-AB G0 (agalacto biantennary)		100%
2-AB Man5		1.9%	2-AB G2 (asialo biantennary)		73.2%
2-AB Man6		6.6%	2-AB G2S2 (α2,6) (sialyl biantennary)		17.1%
2-AB Man8		5.2%	2-AB G2F (core-fucosylated biantennary)		50.1%
2-AB Man9		3.3%	2-AB G3 (triantennary)		Not detected

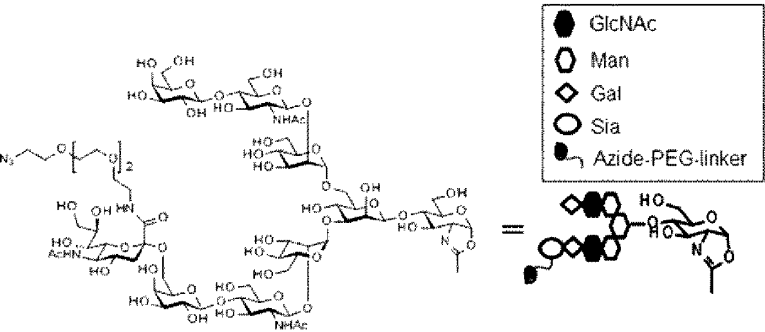
G0糖鎖に対する活性を100%として相対活性を算出した。
●: Mannose, ■: GlcNAc, ○: Galactose, ▼: fucose, ◆: Neu5Ac.

[0110] <実施例 6> E n d o - S i の改変と転移活性の測定

(6 - 1) [N 3 - P E G (3)] - M S G 1 (9) - O x の調製

以降の実施例で糖鎖ドナーとして使用する [N ₃ - P E G (3)] - M S G 1 (9) - O x は、 W O 2 0 1 9 / 0 6 5 9 6 4 の実施例 5 6 に記載の方法で製造した。

[0111] [化6]



[0112] (6 - 2) E n d o - S i の改変と糖鎖転移活性の確認

糖鎖転移活性の高い E n d o - S i 変異酵素を取得すべく、変異導入を実

施した。EndoSの立体構造情報(PDB ID: 4NUY)に基づいて、表1に示す各種変異酵素をデザインし、その抗体に対する糖鎖転移活性を測定した。

[0113] 糖鎖転移活性の評価は次のように行った。(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb2 0.5 mg、糖鎖オキサゾリン体[N3-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox 50.4 μ g(8 eq.)、酵素1.25 μ gを含む50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 45 μ Lを調製し、28℃でインキュベートした。反応1、2、4、6、および24時間の反応液をサンプリングし、上述のタンパク質の全自動電気泳動システムで分析した。得られたクロマトグラムより、未反応物と糖鎖転移体mAb2-(MSG1-N₃)₂が分離したピークとして確認される。未反応物と糖鎖転移体のピーク面積比から糖鎖転移率を下記算出式により算出した。

[0114] 糖鎖転移率(%) = $\left[\frac{[\text{mAb2} - (\text{MSG1} - \text{N}_3)_2 \text{由来のH鎖のピーク面積}]}{\{ [\text{(Fuc}\alpha 1, 6)\text{GlcNAc-mAb2由来のH鎖ピーク面積}] + [\text{mAb2} - (\text{MSG1} - \text{N}_3)_2 \text{由来のH鎖のピーク面積}] \}} \right] \times 100$

同様にして、各Endo-Si変異酵素の、各反応時間における糖鎖転移率を算出した(表5)。

[表5]オキサゾリン体を糖鎖ドナーに用いたEndo-Si WTおよび各変異酵素の糖鎖転移率の経時変化

[0115]

[表5]

	糖鎖転移率(%)				
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Endo-Si WT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
D241Q	75.2	97.0	99.1	99.6	98.8
D241Q/Q311L	5.7	11.6	27.4	44.4	99.3
D241Q/E360Q	73.5	96.8	99.0	99.6	98.9
D241M	98.8	98.9	97.4	97.5	75.0
T190Q	97.2	91.8	81.8	76.7	32.6
D241M/Q311L	31.8	59.1	95.9	99.5	99.9
D241M/E360Q	99.1	99.0	96.2	95.5	75.9
T190Q/D241Q	26.6	48.4	83.3	96.1	99.6
T190Q/D241M	43.5	64.1	92.7	98.7	99.6

Endo-Si WTを除き、各Endo-Si変異酵素はいずれも高い糖鎖転移活性を示した。

[0116] <実施例7>糖鎖ドナーにSGPを用いた糖鎖転移活性の測定

糖鎖転移活性の評価は次のように行った。(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb2 0.5 mg、SGP 0.485 mg (50 eq.)、Endo-M N175Q (東京化成工業製) 2.5 mU、および各種Endo-Si変異酵素 10 μ gを含む50 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液(pH 7.5) 17 μ Lを調製し、23℃でインキュベートした。反応2、4、6、24、および48時間の反応液をサンプリングし、上述のタンパク質の全自動電気泳動システムで分析した。得られたクロマトグラムより、未反応物と糖鎖転移体mAb2-(SG)₂が分離したピークとして確認される。未反応物と糖鎖転移体のピーク面積比から糖鎖転移率を下記算出式により算出した。

$$[0117] \quad \text{糖鎖転移率}(\%) = \left[\frac{[\text{mAb2}-(\text{SG})_2 \text{由来のH鎖のピーク面積}]}{[(\text{Fuc}\alpha 1, 6)\text{GlcNAc-mAb2} \text{由来のH鎖ピーク面積}] + [\text{mAb2}-(\text{SG})_2 \text{由来のH鎖のピーク面積}]} \right] \times 100$$

同様に、各Endo-Si変異酵素の、各反応時間における糖鎖転移

率を算出した（表6）。

[表6] SGPを糖鎖ドナーに用いたEndo-Si WTおよび各変異酵素の糖鎖転移率の経時変化

[0118] [表6]

	糖鎖転移率(%)				
	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h
Endo-Si WT	1.2	1.1	0.0	0.0	0.0
D241Q	15.9	35.6	52.3	98.1	98.5
D241Q/Q311L	2.6	5.6	8.2	48.6	76.3
D241Q/E360Q	8.9	20.0	30.3	94.4	98.5
D241M	12.8	27.9	40.5	96.5	96.8
T190Q	13.3	27.8	43.2	93.8	93.3
D241M/Q311L	6.4	13.7	24.1	79.7	97.0
D241M/E360Q	11.9	27.7	42.7	98.0	98.7
T190Q/D241Q	4.9	10.6	21.4	71.5	92.5
T190Q/D241M	3.1	6.4	13.8	50.7	77.5

Endo-Si WTを除き、各Endo-Si変異酵素はいずれも高い糖鎖転移活性を示した。

[0119] <実施例8> Endo-Rpとの組み合わせによるワンポット法の検討

糖鎖ドナーであるSGPからGlcNAc誘導体への糖鎖転移が知られているEndo-Rpを酵素Aの代表例として使用し、Endo-Siと組み合わせることができる酵素Aの性質を検討した。

[0120] ワンポット法を利用した抗体への糖鎖転移活性の評価は、次のように行った。(Fuc α 1, 6)GlcNAc-mAb2 0.5 mg、SGP 0.485 mg (50 eq.)、Endo-M N175Q (東京化成工業製) 2.5 mUまたは各種Endo-Rp変異酵素 8 μ g、およびEndo-Si D241Q 5 μ gを含む50 mM リン酸 (ナトリウム) 緩衝液 (pH 7.5) 17 μ Lを調製し、28℃でインキュベートした。反応2、4、6、24、および48時間の反応液をサンプリングし、上述のタンパク質の全自動電気泳動システムで分析した。得られたク

ロマトグラムより、実施例5に記載の算出式を用いて糖鎖転移率を算出した。

[0121] 結果を表7に示す。SGPをGlcNAc誘導体に転移する活性が低いEndo-Rp変異酵素、例えば、特許文献3で転移活性が全く見られなかったN172F、N172K、N172L、N172R、N172W、N172Y変異酵素は、ワンポット法においても転移効率が低い結果となった。

[0122] 上記より酵素Aの自身の糖鎖転移活性は、糖鎖原料活性化能力と相関が見られ、SGPからGlcNAc誘導体への転移活性を指標として、糖鎖原料活性化能力を有する適切な酵素Aを特定できると考えられる。一般的に、Endo-M、Endo-Om、Endo-CCは、Endo-Rpと同様の反応性を有していると考えられるため、Endo-RpをEndo-M、Endo-Om、Endo-CCを置き換えて、ワンポット法に有効な酵素Aの特定が可能である。さらに、Endo-Siと同様に抗体へ糖鎖転移活性を有しているEndo-SやEndo-S2の場合でも、この方法は適応できる。

[0123] このように、上記特定法の応用範囲はEndo-SiとEndo-Rpの組み合わせに限定されず、それぞれの酵素と同様の性質をもつ酵素であれば、利用することが可能と考えられる。

[表7]ワンポット法を利用した各種変異酵素による抗体への糖鎖転移活性の経時変化

[0124]

[表7]

変異体	糖鎖転移率(%)の経時変化				
	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h
N172Q	17.3	32.5	44.0	94.8	97.4
N172H	9.1	14.9	20.3	83.7	99.3
N172A	26.7	50.0	66.2	95.9	97.8
N172C	50.8	79.6	91.8	95.2	87.8
N172D	7.0	9.1	9.4	8.2	6.2
N172E	7.7	15.5	23.0	83.8	94.8
N172F	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
N172G	17.8	32.0	44.2	92.8	96.8
N172I	3.9	5.7	7.6	29.2	71.2
N172K	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0
N172L	0.0	0.0	0.0	2.1	3.1
N172M	4.2	8.1	11.2	49.3	82.7
N172P	4.0	8.2	11.8	55.3	90.2
N172R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
N172S	36.5	62.1	78.4	93.2	85.8
N172T	44.4	72.7	87.8	96.5	94.4
N172V	28.3	55.0	76.7	97.9	97.7
N172W	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
N172Y	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
W278F/S216V	4.4	7.7	8.2	29.7	61.2
W278F/N246D	1.5	5.4	6.4	18.2	35.1
W278F/D276N	0.0	5.1	6.7	23.6	57.5
W278F/A310D	5.4	7.4	9.1	22.1	36.3
W278F/N172D/F307Y	12.0	19.0	24.9	76.5	93.1
W278F/N172D/F307H	8.8	13.4	17.7	66.1	91.1
W278F/N172D/A310D	0.0	0.0	0.0	8.5	17.0
Y214F/F307Y/L306I	34.5	53.0	63.4	87.4	88.8

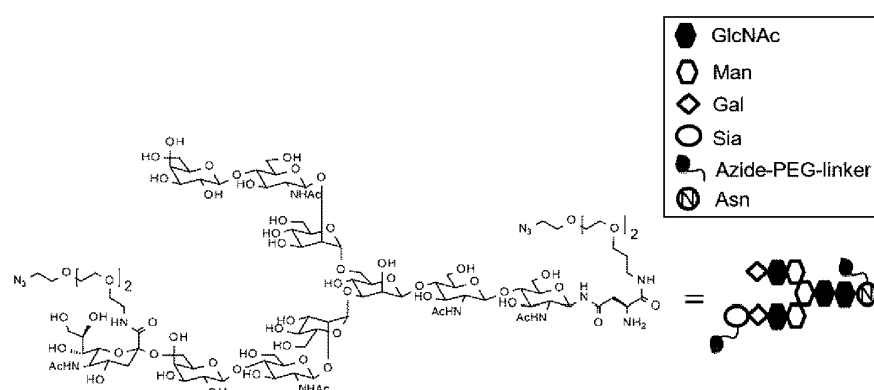
[0125] <実施例 9> 化学修飾した糖鎖誘導体をドナーに用いたワンポット法の検討

天然型糖鎖であるSGP以外の糖鎖誘導体ドナーとして、非還元末端側と還元末端アミノ酸がアジド修飾された誘導体を準備し、ワンポット法における糖鎖転移反応を検討した。

(9-1) ($[N_3-PEG(3)]-MSG1-$) Asn-PEG(3)- N_3 の調製

以降の実施例で糖鎖ドナーとして使用する ($[N_3-PEG(3)]-MSG1-$) Asn-PEG(3)- N_3 は、WO2019065964の実施例154の工程3に記載された方法で製造した。

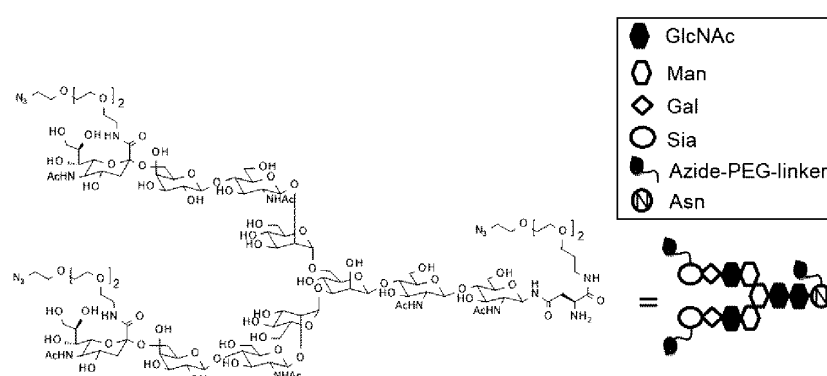
[0126] [化7]



[0127] (9-2) ($[N_3-PEG(3)]_2-SG-$) Asn-PEG(3)- N_3 の調製

以降の実施例で糖鎖ドナーとして使用する ($[N_3-PEG(3)]_2-SG-$) Asn-PEG(3)- N_3 は、WO2018003983の実施例1-12、工程1-12Aに記載された方法で製造した。

[0128] [化8]



[0129] (9-3) 糖鎖転移活性評価

糖鎖転移活性の評価は、次のように行った。(Fuc α 1,6)GlcN

Ac-mAb2 0.5 mg、SGP 0.485 mg (50 eq.)
) または ($[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]\text{-MSG1-Asn-PEG}(3)\text{-N}_3$ 0.415 mg (50 eq.) または ($[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]_2\text{-SG-Asn-PEG}(3)\text{-N}_3$ 0.495 mg (50 eq.)、
 Endo-Rp N172H 8 μg 、および Endo-Si D241M
 Q311L 10 μg / 50 mM リン酸 (ナトリウム) 緩衝液 (pH 7.5) 17 μL を調製し、28℃でインキュベートした。反応2時間、4時間、6時間、24時間、および48時間の反応液をサンプリングし、上述のタンパク質の全自動電気泳動システムで分析した。転移反応物として、SGPをドナーに用いた場合は実施例7に記載の mAb2-(SG)_2 、 $[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]\text{-MSG1-Asn-PEG}(3)\text{-N}_3$ をドナーに用いた場合は $\text{mAb2-(MSG1-N}_3)_2$ (図21)、 $[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]_2\text{-SG-Asn-PEG}(3)\text{-N}_3$ をドナーに用いた場合は $\text{mAb2-[SG-(N}_3)_2]_2$ (図22、式中では $\text{mAb2-(SG-N}_3)_2$ と呼称する) がそれぞれ生成する。得られたクロマトグラムより、未反応物と各糖鎖転移体が分離したピークとして確認される。SGPをドナーに用いた場合の糖鎖転移率は、実施例5に記載の式を用いて算出した。 $[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]\text{-MSG1-Asn-PEG}(3)\text{-N}_3$ をドナーに用いた場合の糖鎖転移率は、実施例4-2に記載の式を用いて算出した。また $[\text{N}_3\text{-PEG}(3)]_2\text{-SG-Asn-PEG}(3)\text{-N}_3$ をドナーに用いた場合の糖鎖転移率は、以下の式を用いて算出した。

$$\begin{aligned}
 \text{糖鎖転移率 (\%)} &= \left[\frac{[\text{mAb2-(SG-N}_3)_2 \text{ 由来の H 鎖のピーク面積}]}{\{ [\text{(Fuc}\alpha 1, 6)\text{GlcNAc-mAb2 由来の H 鎖ピーク面積}] + [\text{mAb2-(SG-N}_3)_2 \text{ 由来の H 鎖のピーク面積}] \}} \right] \\
 &\times 100
 \end{aligned}$$

結果を表8に示す。天然型の糖鎖構造だけでなく、化学修飾された糖鎖をドナーに用いた場合も、ワンポット転移反応が進行することが確認された。
 [表8]ワンポット法を利用した各種糖鎖ドナーの抗体への糖鎖転移活性の経

時変化

[0130] [表8]

糖鎖ドナー	糖鎖転移率 (%)				
	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h
SGP	3.8	5.0	11.2	53.5	89.7
[(N ₃ -PEG(3))-MSG1-]Asn-PEG(3)-N ₃	6.6	13.6	19.9	83.5	99.0
[(N ₃ -PEG(3)) ₂ -SG-]Asn-PEG(3)-N ₃	5.0	12.5	16.2	62.3	94.0

産業上の利用可能性

[0131] 本発明のEndo-Si酵素を用いて得られた均一な糖鎖を有する抗体もしくは糖鎖含有分子を、効率よく、又は高純度で取得することができ、該抗体等を医薬として利用することができる。

配列表フリーテキスト

[0132] 配列番号1 : Endo-Si 塩基配列

配列番号2 : Endo-Si アミノ酸配列

配列番号3 : Endo-Si アミノ酸配列 D241Q

配列番号4 : Endo-Si アミノ酸配列 D241Q/Q311L

配列番号5 : Endo-Si アミノ酸配列 D241Q/E360Q

配列番号6 : Endo-Si アミノ酸配列 D241M

配列番号7 : Endo-Si アミノ酸配列 D241M/Q311L

配列番号8 : Endo-Si アミノ酸配列 D241M/E360Q

配列番号9 : Endo-Si アミノ酸配列 T190Q/D241Q

配列番号10 : Endo-Si アミノ酸配列 T190Q

配列番号11 : Endo-Si アミノ酸配列 T190Q/D241M

配列番号12 : mAb2 軽鎖アミノ酸配列

配列番号13 : mAb2 重鎖アミノ酸配列

配列番号14 : プライマー1

配列番号15 : プライマー2

配列番号16 : Endo-Si 大腸菌用配列

配列番号 17 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 Q
配列番号 18 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 H
配列番号 19 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 A
配列番号 20 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 C
配列番号 21 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 D
配列番号 22 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 E
配列番号 23 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 F
配列番号 24 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 G
配列番号 25 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 I
配列番号 26 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 K
配列番号 27 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 L
配列番号 28 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 M
配列番号 29 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 P
配列番号 30 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 R
配列番号 31 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 S
配列番号 32 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 T
配列番号 33 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 V
配列番号 34 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 W
配列番号 35 : E n d o - R p	アミノ酸配列	N 1 7 2 Y
配列番号 36 : E n d o - R p	アミノ酸配列	W 2 7 8 F / S 2 1 6 V
配列番号 37 : E n d o - R p	アミノ酸配列	W 2 7 8 F / N 2 4 6 D
配列番号 38 : E n d o - R p	アミノ酸配列	W 2 7 8 F / D 2 7 6 N
配列番号 39 : E n d o - R p	アミノ酸配列	W 2 7 8 F / A 3 1 0 D
配列番号 40 : E n d o - R p	アミノ酸配列	W 2 7 8 F / N 1 7 2 D / F 3 0 7 Y
配列番号 41 : E n d o - R p	アミノ酸配列	W 2 7 8 F / N 1 7 2 D / F 3 0 7 H
配列番号 42 : E n d o - R p	アミノ酸配列	W 2 7 8 F / N 1 7 2 D /

A 3 1 0 D

配列番号 4 3 : E n d o - R p アミノ酸配列 W 2 7 8 F / F 3 0 7 Y /
L 3 0 6 I

配列番号 4 4 : E n d o - M アミノ酸配列

配列番号 4 5 : E n d o - O m アミノ酸配列

配列番号 4 6 : E n d o - C C アミノ酸配列

[0133] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号2のアミノ酸番号34乃至928に記載のアミノ酸配列、又は、
前記アミノ酸配列において、241番目(D241)、190番目(T190)、311番目(Q311)及び360番目(E360)のアミノ酸からなる群より選択される1又は2以上のアミノ酸部位への変異を含むアミノ酸配列を有し、かつ、糖鎖加水分解活性及び／又は糖鎖転移活性を示すポリペプチド。
- [請求項2] 変異が、D241、T190、Q311及びE360のアミノ酸からなる群より選択される1～3個のアミノ酸部位に変異を有することを特徴とする、請求項1に記載のポリペプチド。
- [請求項3] 以下の(A)～(D)からなる群から選択される1又は2以上の変異を有する、請求項1又は2に記載のポリペプチド；
(A) 配列番号2のアミノ酸配列において、241番目のアミノ酸(D241)が、グルタミン(D241Q)、メチオニン(D241M)、若しくはアラニン(D241A)へ変異、
(B) 配列番号2のアミノ酸配列において、190番目のアミノ酸(T190)が、グルタミン(T190Q)へ変異、
(C) 配列番号2のアミノ酸配列において、311番目のアミノ酸(Q311)が、ロイシン(Q311L)へ変異、並びに、
(D) 配列番号2のアミノ酸配列において、360番目のアミノ酸(E360)が、グルタミン(E360Q)、アラニン(E360A)、アスパラギン(E360N)、若しくはアスパラギン酸(E360D)へ変異。
- [請求項4] 以下の(A)～(D)からなる群から選択される1又は2以上の変異を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド；
(A) D241Q又はD241M、
(B) T190Q、

- (C) Q 3 1 1 L、及び、
(D) E 3 6 0 Q。
- [請求項5] 以下の (A) ～ (C) のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド；
(A) 配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 及び配列番号 11 からなる群より選択されるアミノ酸配列、
(B) (A) の各配列における 241 番目、190 番目、311 番目、又は、360 番目のアミノ酸以外のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% 以上の相同性もしくは同一性を有するアミノ酸配列、又は、
(C) (A) の配列において 241 番目、190 番目、311 番目、又は、360 番目のアミノ酸以外のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、および／または付加されたアミノ酸配列。
- [請求項6] N 結合型糖鎖に対して、加水分解活性及び／又は糖鎖転移活性を示す、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のポリペプチド。
- [請求項7] N 結合型糖鎖が、糖タンパク質における N 結合型糖鎖である、請求項 6 に記載のポリペプチド。
- [請求項8] 糖タンパク質が、抗体又は抗体の Fc 領域を含む分子 (Fc 領域含有分子) である、請求項 6 又は 7 に記載のポリペプチド。
- [請求項9] N 結合型糖鎖が、抗体の 297 番目の Asn に結合する N 結合型糖鎖 (N297 結合糖鎖) である、請求項 6 ～ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。
- [請求項10] N297 結合糖鎖の非還元末端が化学修飾されていてもよい複合型糖鎖である、請求項 9 に記載のポリペプチド。
- [請求項11] N297 結合糖鎖が、コア G1cNAc にフコースが付加していてもよい N297 結合糖鎖である、請求項 9 又は 10 に記載のポリペプチド。

- [請求項12] 請求項1～11のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [請求項13] 請求項12に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
- [請求項14] 請求項13に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。
- [請求項15] 請求項14に記載の宿主細胞を培養する工程、および当該工程で得られた培養物から目的のポリペプチドを採取する工程を含むことを特徴とする、請求項1～11のいずれか一項に記載のポリペプチドの製造方法。
- [請求項16] 請求項15に記載の製造方法によって得られた、ポリペプチド。
- [請求項17] 請求項1～11のいずれか一項に記載のポリペプチドの存在下で、N297結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコアGlcNAcを有する抗体又はそのFc領域含有分子であるアクセプター分子を、還元末端が活性化されたGlcNAcを含む糖鎖ドナー分子と反応させることを特徴とする、抗体又はそのFc領域含有分子の製造方法。
- [請求項18] 還元末端が活性化されたGlcNAcが、オキサゾリン化されたGlcNAcである、請求項17に記載の製造方法。
- [請求項19] 糖鎖ドナー分子が、非還元末端が化学修飾されていてもよい複合型糖鎖である、請求項17又は18に記載の製造方法。
- [請求項20] 糖鎖ドナー分子が、非還元末端が化学修飾されていてもよいSG(10)-Ox、MSG1(9)-Ox、MSG2(9)-Ox又はMSG1(9)-OxとMSG2(9)-Oxの混合物である、請求項17～19のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項21] 糖鎖ドナー分子が、 $[N_3-PEG(3)]_2-SG(10)-Ox$ 、 $[N_3-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox$ 、 $[N_3-PEG(3)]-MSG2(9)-Ox$ 、又は $[N_3-PEG(3)]-MSG1(9)-Ox$ と $[N_3-PEG(3)]-MSG2(9)-Ox$ の混合物である、請求項17～20のいずれか一項に記載の製造方法。

法。

- [請求項22] 更に、アジド基 (N_3 -) にアルキン構造を有する分子と反応させる工程を含む、請求項21に記載の製造方法。
- [請求項23] アルキン構造を有する分子が、化学療法剤、分子標的薬、免疫活性化剤、毒素、抗菌剤、抗ウイルス剤、診断用薬剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸分子、核酸、抗原、脂質、リポソーム、ビタミン、ホルモンから選択される、請求項22に記載の製造方法。
- [請求項24] 化学療法剤が、カンプトテシン、ピロロベンゾジアゼピン、ドキソルビシン、オーリスタチン、タキサンもしくはその誘導体から選択される、請求項23に記載の製造方法。
- [請求項25] 免疫活性化剤が、STINGアゴニスト、TLRアゴニスト、A2ARアンタゴニスト、IDO阻害剤、CTLA-4、LAG-3及びPD-1経路のアンタゴニスト、チェックポイント阻害剤、血管内皮増殖因子(VEGF)受容体阻害剤、スムーゼン(smoothen)阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、レチノイド、抗がんワクチン、アジュバントから選択される、請求項23に記載の製造方法。
- [請求項26] アルキン構造を有する分子が、(A)～(E)からなる群から選択される、請求項23～25のいずれか一項に記載の製造方法；
- (A) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[({[(11'S, 11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{[(11aS)-7'-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル]カルボニル}オキシ)メチ

ル] フェニル} -L-アラニンアミド、

(B) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-({[(11' S, 11' a S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - (3- {[(11 a S) -7-メトキシ-2- (4-メトキシフェニル) -5-オキソ-5, 10, 11, 11 a-テトラヒドロ-1H-ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン-8-イル] オキシ} プロボキシ) -5' -オキソ-11', 11' a-ジヒドロ-1' H, 3' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -カルボニル] オキシ} メチル) フェニル] -L-アラニンアミド、

(C) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[({[(11' S, 11 a' S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- {[(11 a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5', 11 a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル] オキシ} ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-11', 11 a' -ジヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド、

(D) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[({[(11' S, 11 a' S) -11' -ヒドロキシ-7' -メトキシ-8' - [(5- {[(11 a' S) -7' -メトキシ-5' -オキソ-5', 10', 11', 11

a' -テトラヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -
 ピロロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -8' -イル]
 オキシ} ペンチル) オキシ] -5' -オキソ-11', 11a' -ジ
 ヒドロ-1' H-スピロ [シクロプロパン-1, 2' -ピロロ [2,
 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル]
 カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド、並
 びに、

(E) (ビス (N, N-ジエチルエタンアミニウム) N- [4- (11, 12-ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン-5 (6H) -
 イル) -4-オキソブタノイル] グリシルグリシル-L-フェニルア
 ラニル-N- [(2- {9- [(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R) -15-フルオロ-16-ヒドロキ
 シ-2, 10-ジオキソ-2, 10-ジスルフィド-14- (6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ
 [c d] アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-
 5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデ
 シン-7-イル] -6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-
 1-イル} エトキシ) メチル] グリシンアミド。

[請求項27] アクセプター分子が、フコースが付加していてもよいコアGlcNAcからなるN297結合糖鎖を有する抗体又はFc領域含有分子である請求項17～26のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項28] 請求項1～11のいずれか一項に記載のポリペプチド及び還元末端が活性化されていない糖鎖ドナー分子の複合型糖鎖を基質とするがN297結合糖鎖を基質としないエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ（酵素A）の存在下で、
 N297結合糖鎖としてフコースが付加していてもよいコアGlcNAcを有する抗体若しくはそのFc領域含有分子であるアクセプター

分子を、還元末端が活性化されていないGlcNAcを含む糖鎖ドナー分子と反応させることを特徴とする、抗体又はFc領域含有分子の製造方法。

[請求項29] 請求項1～11のいずれか一項に記載のポリペプチド、酵素A、アクセプター分子及び糖鎖ドナー分子を同一の反応液中で反応させることを特徴とする、請求項28に記載の製造方法。

[請求項30] 糖鎖ドナー分子が、非還元末端が化学修飾されていてもよい複合型糖鎖である、請求項28又は29に記載の製造方法。

[請求項31] 糖鎖ドナー分子が、非還元末端が化学修飾されていてもよいSGP、(SG-)Asn、(MSG1-)Asn、(MSG2-)Asn、(MSG1-)Asnと(MSG2-)Asnの混合物である、請求項28～30のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項32] 糖鎖ドナー分子が、([N₃-PEG(3)]₂-SG-)Asn-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG1-)Asn-PEG(3)-N₃、([N₃-PEG(3)]-MSG2-)Asn-PEG(3)-N₃、又は([N₃-PEG(3)]-MSG1-)Asn-PEG(3)-N₃と([N₃-PEG(3)]-MSG2-)Asn-PEG(3)-N₃の混合物である、請求項28～31のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項33] 更に、アジド基(N₃-)にアルキン構造を有する分子と反応させる工程を含む、請求項32に記載の製造方法。

[請求項34] アルキン構造を有する分子が、化学療法剤、分子標的薬、免疫活性化剤、毒素、抗菌剤、抗ウイルス剤、診断用薬剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、抗原、脂質、リポソーム、ビタミン、ホルモンから選択される、請求項33に記載の製造方法。

[請求項35] 化学療法剤が、カンプトテシン、ピロロベンゾジアゼピン、ドキソルビシン、オーリスタチン、タキサンもしくはその誘導体から選択される、請求項34に記載の製造方法。

[請求項36] 免疫活性化剤が、STINGアゴニスト、TLRアゴニスト、A2ARアンタゴニスト、IDO阻害剤、CTLA-4、LAG-3及びPD-1経路のアンタゴニスト、チェックポイント阻害剤、血管内皮増殖因子(VEGF)受容体阻害剤、スムーズン(smoothen)阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、レチノイド、抗がんワクチン、アジュバントから選択される、請求項35に記載の製造方法。

[請求項37] アルキン構造を有する分子が、(A)～(E)からなる群から選択される、請求項34～36のいずれかに記載の製造方法；

(A) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[(11'S, 11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{[(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-5'-オキソ-11', 11a'-ジヒドロ-1'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン]-10'(5'H)-イル]カルボニル}オキシ)メチル]フェニル}-L-アラニンアミド、

(B) N-[4-(11, 12-ジデヒドロジベンゾ[b, f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-[4-[(11'S, 11'aS)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(3-{[(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5, 10, 11, 11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}プロボキシ)-5'-オキソ-11', 11'a-ジヒドロ-1'H, 3'H-スピロ[シクロプロパン-1, 2'-ピロロ[2, 1-c][1, 4]ベンゾジ

アゼピン] - 10' (5' H) - カルボニル} オキシ} メチル) フェニル] - L - アラニンアミド、

(C) N - [4 - (11, 12 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - バリル - N - {4 - [({ [(11' S, 11 a' S) - 11' - ヒドロキシ - 7' - メトキシ - 8' - [(5 - { [(11 a' S) - 7' - メトキシ - 5' - オキソ - 5' , 11 a' - ジヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 8' - イル] オキシ} ペンチル) オキシ] - 5' - オキソ - 11' , 11 a' - ジヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) - イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} - L - アラニンアミド、

(D) N - [4 - (11, 12 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - バリル - N - {4 - [({ [(11' S, 11 a' S) - 11' - ヒドロキシ - 7' - メトキシ - 8' - [(5 - { [(11 a' S) - 7' - メトキシ - 5' - オキソ - 5' , 10' , 11' , 11 a' - テトラヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 8' - イル] オキシ} ペンチル) オキシ] - 5' - オキソ - 11' , 11 a' - ジヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 10' (5' H) - イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} - L - アラニンアミド、並びに、

(E) (ビス (N, N - ジエチルエタンアミニウム) N - [4 - (11, 12 - ジデヒドロジベンゾ [b, f] アゾシン - 5 (6 H) - イル) - 4 - オキソブタノイル] グリシルグリシル - L - フェニルア

ラニル-N-[(2-{9-[(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-15-フルオロ-16-ヒドロキシ-2, 10-ジオキソ-2, 10-ジスルフィド-14-(6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [cd] アズレン-2-イル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ⁵, 10λ⁵-フロ [3, 2-1] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテラデシン-7-イル]-6-オキソ-6, 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル} エトキシ) メチル] グリシンアミド。

- [請求項38] アクセプター分子が、フコースが付加していてもよいコアGlcNAcからなるN297結合糖鎖を有する抗体又はもしくはFc領域含有分子である請求項28～37のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項39] 酵素Aが、SGPからGlcNAcを有するアクセプターへの糖鎖転移活性を有する酵素である、請求項28～38のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項40] 酵素Aが、Endo-M、Endo-Rp、Endo-Om、Endo-CC、又はそれらの加水分解活性を低下させた変異酵素である、請求項28～39のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項41] 加水分解活性を低下させた変異酵素が、Endo-Rp N172Q、Endo-Rp N172H、Endo-Rp N172A、Endo-Rp N172C、Endo-Rp N172D、Endo-Rp N172E、Endo-Rp N172G、Endo-Rp N172I、Endo-Rp N172L、Endo-Rp N172M、Endo-Rp N172P、Endo-Rp N172S、Endo-Rp N172T、Endo-Rp N172V、Endo-Rp W278F/S216V、Endo-Rp W278F/N246D、Endo-Rp W278F/D276N、Endo-Rp W278F/A310D、Endo-Rp W278F/N1

72D/F307Y、Endo-Rp W278F/N172D/F307H、Endo-Rp W278F/N172D/A310D、Endo-Rp W214F/F307Y/L306I、Endo-M N175Q、Endo-CC N180H及びEndo-Om N194Qからなる群から選択される、請求項40に記載の製造方法。

- [請求項42] 請求項17～41のいずれか一項に記載の製造方法で得られた抗体又はFc領域含有分子。
- [請求項43] 抗体又はFc領域含有分子に、配列番号2のアミノ酸番号34乃至928に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを作用させることを特徴とする、フコースが付加していてもよいコアGlcNAcのみを有する抗体又はFc領域含有分子の製造方法。
- [請求項44] 請求項43に記載の製造方法で得られたコアGlcNAcのみを有する抗体又はFc領域含有分子。